

SÉRIE A, n° 1606.

N° D'ORDRE :

2472.

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

RENÉ PARIS,

PHARMACIEN,

EX-INTERNE MÉDAILLE D'OR DES HÔPITAUX DE PARIS.

1^{re} Thèse : **Action [de diverses substances organiques volatiles sur quelques glucidases *in vivo* et *in vitro*.**

2^e Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 19 DECE 1935 devant la Commission d'Examen.

Président : MM. M. JAVILLIER.

Examineurs : { R. COMBES.
H. LAUGIER.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1935

SÉRIE A, n° 1606.

N° D'ORDRE :

2472.

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

RENÉ PARIS,

PHARMACIEN,

EX-INTERNE MÉDAILLE D'OR DES HÔPITAUX DE PARIS.

1^{re} Thèse : **Action de diverses substances organiques volatiles sur quelques glucidases *in vivo* et *in vitro*.**

2^e Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le

1935 devant la Commission d'Examen.

Président : MM. M. JAVILLIER.

Examineurs : { R. COMBES.
H. LAUGIER.

LONS-LÉ-SAÛNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1935

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

<i>Professeurs honoraire</i> s.	H. LE CHATELIER.	E. GOURSAT.	DANGEARD.
	H. LEBESQUE.	WALLERANT.	JANET.
	A. FERNBACH.	GUILLET.	LESPIEAU.
	A. LEDUC.	PÉCHARD.	MARCHIS.
	EMILE PICARD.	FREUNDLER.	MOUTON.
	Rémy PERRIER.	AUGER.	VESSIOT.
	LÉON BRILLOUIN.	BLAISE.	

PROFESSEURS

G. BERTRAND.....	T Chimie biologique.	A. DUFOUR.....	T Physique (P.C.B.).
M. CAULLERY.....	T Zoologie (Evolution des êtres organisés).	L. DUNOYER.....	Optique appliquée.
G. URBAIN.....	T Chimie générale.	A. GUILLIERMOND.	T Botanique (P.C.B.).
Emile BOREL.....	T Calcul des probabilités et Physique mathém.	M. JAVILLIER.....	Chimie biologique.
Jean PERRIN.....	T Chimie physique.	L. JOLEAUD.....	Paléontologie.
H. ABRAHAM.....	T Physique.	ROBERT LÉVY.....	Zoologie.
E. CARTAN.....	T Géométrie supérieure.	F. PICARD.....	Zoologie (Evolution de êtres organisés).
M. MOLLIARD.....	T Physiologie végétale.	Henri VILLAT.....	T Mécanique des fluides et applications.
L. LAPICQUE.....	T Physiologie générale.	Ch JACOB.....	T Géologie.
A. COTTON.....	T Recherches Physiques.	P. PASCAL.....	T Chimie minérale.
J. DRACH.....	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	M. FRÉCHET.....	T Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
Charles FABRY.....	T Enseignement de Physique.	E. ESCLANGON.....	T Astronomie.
Charles PÉREZ.....	T Zoologie.	M ^{me} RAMART-LUCAS.	T Chimie organique.
Léon BERTRAND...	T Géologie structurale et géologie appliquée.	H. BÉGHIN.....	T Mécanique physique et expérimentale.
P. PORTIER.....	T Physiologie comparée.	FOCH.....	Mécanique expérimentale des fluides.
E. RABAUD.....	T Biologie expérimentale	PAUTHENIER.....	Physique (P.C.B.).
M. GUICHARD.....	Chimie minérale.	DE BROGLIE.....	T Théories physiques.
Paul MONTEL.....	T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
P. WINTREBERT...	T Anatomie et histologie comparées.	P. JOB.....	Chimie générale.
L. BLARINGHEM ..	T Botanique.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
O. DUBOSQ.....	T Biologie maritime.	PRENANT.....	Zoologie.
G. JULIA.....	T Application de l'analyse à la Géométrie.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
C. MAUGUIN.....	T Minéralogie.	BOHN.....	Zoologie (P.C.B.).
A. MICHEL-LÉVY..	Pétrographie.	COMBES.....	Botanique.
H. BÉNARD.....	T Mécanique expérimentale des fluides.	GARNIER.....	Calcul différentiel.
A. DENJOY.....	T Calcul différentiel et calcul intégral.	PÈRES.....	Mécanique des fluides.
L. LUTAUD.....	T Géographie physique et géologie dynamique.	HACKSPILL.....	Chimie (P.C.B.).
Eugène BLOCH....	T Physique théorique et physique céleste.	LAUGIER.....	Physiologie générale.
G. BRUHAT.....	Physique.	TOUSSAINT.....	Technique Aéronautique.
E. DARMOIS.....	Physique.	M. CURIE.....	Physique (P.C.B.).
A. DEBIERNE.....	T Radioactivité.	G. RIBAUD.....	T Hautes températures.
		CHAZY.....	T Mécanique rationnelle.
		GAULT.....	Chimie (P.C.B.).
		CROZE.....	Physique.
		DUPONT.....	T Théories chimiques.
		LANQUINE.....	Géologie.
		VALIRON.....	Mathématiques.

Secrétaire.....

A. PACAUD.

Secrétaire honoraire.....

D. TOMBECK



A MONSIEUR M. JAVILLIER,

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS,
PROFESSEUR DE CHIMIE AGRICOLE ET BIOLOGIQUE AU CONSERVATOIRE NATIONAL
DES ARTS ET MÉTIERS.

*Qui a bien voulu accepter la prési-
dence de mon jury de thèse.*

Hommage de respectueuse gratitude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MON MAÎTRE

MONSIEUR M. MASCRÉ

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
PHARMACIEN-CHEF DE L'HOPITAL LARIBOSIÈRE.

Hommage de profonde reconnaissance.

A MES PARENTS,

A MA FEMME,

En témoignage de profonde affection.

Nous avons entrepris ce travail sur les conseils de M. le Professeur agrégé MASCRÉ. C'est pour nous un agréable devoir d'assurer ici ce Maître bienveillant de notre profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il nous a toujours témoigné et pour les précieux enseignements dont il nous a fait profiter. Depuis que nous sommes entrés dans son laboratoire, il n'a cessé de s'intéresser à nos recherches et de nous prodiguer avec une patience jamais lassée de judicieux conseils et de nombreux encouragements qui nous ont permis de mener à bien ce travail. Qu'il soit persuadé que nous n'oublierons jamais toute la bonté dont il a fait preuve à notre égard.

Nous tenons également à exprimer nos respectueux remerciements à M. le Professeur JAVILLIER, qui nous a toujours réservé le meilleur accueil et qui nous a fait honneur d'accepter la présidence de notre thèse. Nous l'assurons de toute notre gratitude pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués au cours de ce travail et pour les critiques si utiles dont il a bien voulu nous faire part.

Nous prions MM. les Professeurs COMBES et LAUGIER, qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse, de croire à nos sentiments respectueusement reconnaissants.

TABLE DES MATIÈRES.

	Pages
INTRODUCTION	11
Généralités sur les glucidases.....	18

PREMIÈRE PARTIE.

A. Etude de l'émulsine *in vivo*.

CHAPITRE I. — Choix du matériel d'étude. Principe des dosages	33
CHAPITRE II. — Expériences sur les feuilles d' <i>Aucuba</i> ,	
<i>a</i>) Généralités	36
<i>b</i>) Action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine	39
CHAPITRE III. — Expériences sur les feuilles de <i>Laurier-cerise</i> ,	
<i>a</i>) Généralités	57
<i>b</i>) Action du chloroforme, de l'éther, du formol, de l'acroléine	60
CONCLUSIONS	84

B. Etude de l'émulsine *in vitro*.

<i>a</i>) Préparation de différentes émulsines.....	87
<i>b</i>) Action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine	93
Interprétation des résultats	122
CONCLUSIONS	128

DEUXIÈME PARTIE.

Etude de la rhamnodiastase.

Généralités	131
A. Etude <i>in vivo</i>	133
B. Etude <i>in vitro</i>	141
Conclusions	144

TROISIÈME PARTIE.

Etude de la Myrosine.

Généralités	145
Etude <i>in vivo</i>	146
Conclusions	149

QUATRIÈME PARTIE.

A. Etude de l'invertine ou sucrase *in vivo*.

a) Choix du matériel d'étude et technique employée	151
b) Action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine	152
CONCLUSIONS	173

B. Etude de l'invertine ou sucrase *in vitro*

Interprétation des résultats	176
CONCLUSIONS	190
	193

CINQUIÈME PARTIE.

Etude de l'amylase.

Généralités	195
A. Etude <i>in vivo</i>	197
B. Etude <i>in vitro</i>	203
Conclusions	207
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	209
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	215

INTRODUCTION.

Chez les végétaux, comme chez tous les êtres vivants, existent des substances de composition encore mal définie, de nature colloïdale, et se comportant comme des catalyseurs des réactions biochimiques. Ce sont les diastases qui, en raison même de ces propriétés, jouent un rôle fondamental dans les phénomènes de la vie.

Leur découverte est relativement récente, puisque c'est au début du XIX^e siècle que furent isolés les premiers précipités diastasiques. On sait que le premier ferment fut retiré de l'Orge germée, en 1833, par PAYEN et PERSOZ [170], et nommé « diastase » pour rappeler les propriétés qu'il possède « de séparer les enveloppes des globules de fécule de leur matière intérieure ».

Depuis lors, on a étendu le nom de diastases à tous les produits analogues dont la liste s'est rapidement allongée.

Aussitôt après leur découverte, les diastases furent l'objet de nombreuses recherches orientées dans les directions différentes. Certains travaux effectués *in vitro* eurent pour but la caractérisation de nouvelles espèces diastasiques, leur purification, la détermination de l'activité des produits obtenus.

Dès 1892, on émit l'idée que les réactions diastasiques devaient être réversibles, c'est-à-dire qu'elles pourraient s'exercer aussi bien dans le sens de la synthèse que dans celui de l'hydrolyse. C'est CROFT HILL qui, en 1898, réalisa la première synthèse biochimique d'un holoside en faisant agir un macéré de levure basse sur une solution de glucose. En 1906, POTTEVIN montra l'action synthétisante du tissu pancréatique sur des mélanges d'acides gras et d'alcool. Puis, en 1912, BOURQUELOT et ses élèves préparèrent, à l'aide de l'émulsine, de nombreux hétérosides d'alcool. On pouvait donc penser à la suite de ces expériences que les ferments ont aussi, *in vivo* et dans certaines conditions, une action synthétisante.

Dans d'autres recherches, poursuivies plus particulièrement

in vivo, on eut surtout en vue l'étude de la répartition des diastases et la détermination de leur rôle chez les végétaux.

Au cours de la vie d'un végétal, à certains moments, il y a prédominance de la synthèse ; à d'autres moments il y a, au contraire, prédominance de l'hydrolyse. Or, si nous envisageons l'activité diastasique *in vivo*, nous voyons que celle-ci est habituellement réduite, tandis que, dans certaines conditions physiologiques (germination) ou pathologiques (influence des anesthésiques) elle s'exagère brusquement. Il en est de même lors de la mort du végétal (ce qui prouve que l'activité diastasique n'est pas liée à la vie des cellules) et d'ailleurs, les variations de composition des végétaux lors de la dessiccation sous l'influence des diastases présentent un gros intérêt physiologique et pharmacologique. Elles ont donné lieu aux belles recherches de BOURQUELOT, de PERROT et GORIS [173], sur la stabilisation, qui tue les ferments et empêche toute modification ultérieure de la composition de la plante.

Pourquoi l'activité des diastases est-elle habituellement réduite *in vivo*, et pourquoi s'exagère-t-elle dans certaines conditions (germination ou influence de certaines substances chimiques) ?

On peut expliquer ce phénomène de deux façons différentes : soit par une élaboration, une augmentation de la quantité de diastase ;

soit par une activation de la diastase préformée.

Si la première hypothèse peut à la rigueur se soutenir dans certains cas (par exemple, augmentation de l'amylase lors de la germination), la deuxième semble plus générale et plus vraisemblable (en particulier lors de l'activation du pouvoir hydrolysant après la mort des tissus).

Mais alors, comment expliquer cette activité ralentie, cette « inhibition » des diastases *in vivo* ?

On peut supposer que celles-ci ne seraient pas préformées et existeraient à l'état de prodiastases — ou encore que les ferments dans les tissus vivants auraient des entraves, des liens physico-chimiques, entreraient dans des complexes (de nature encore inconnue).

Une deuxième hypothèse est celle de la présence d'anti-ferments. On peut encore invoquer des conditions défavorables (au point de vue pH, rH, etc.). Ainsi, d'après certains auteurs, le milieu vivant serait trop alcalin, l'acidification qui se produit après la mort serait au contraire favorable aux actions diastasiques,

En corrélation avec cette faible activité (1) *in vivo*, remarquons qu'en général les tissus vivants ne cèdent pas ou presque pas leurs diastases aux solvants habituels des ferments. Pour extraire ceux-ci, il faut un traitement préalable (dessiccation, broyage, autolyse). Cependant, nous avons vu que dans certaines conditions physiologiques ou expérimentales (action de certaines vapeurs, du gel, des rayons ultra-violet, de la lumière polarisée) [111] ces diastases peuvent devenir actives *in vivo*, et c'est ce phénomène qui a retenu notre attention.

C'est GUIGNARD [119] qui, en 1909, signala le dédoublement diastasique des glucosides *in vivo* sous l'influence des vapeurs de chloroforme. Il obtint un dégagement d'essence sulfurée en traitant de la sorte différentes plantes de la famille des Crucifères (Moutarde noire, Raifort, etc...). Il y avait donc, dans ces conditions une « activation » du ferment, la myrosine, et dédoublement des glucosides. Ces expériences furent étendues à d'autres plantes contenant des hétérosides tributaires d'autres ferments (émulsine, rhamnodiastase). Traitées par les vapeurs de chloroforme, les plantes à glucosides cyanogénétiques et en particulier le Laurier-cerise, donnent naissance à des quantités plus ou moins grandes d'acide cyanhydrique. Avec la Gaultherie on a un dégagement de salicylate de méthyle provenant du dédoublement d'un glucoside, le monotroposide.

MIRANDE [158-159] continua les expériences de son maître GUIGNARD et montra qu'en dehors des anesthésiques, les vapeurs de nombreux corps organiques étaient capables de provoquer plus ou moins rapidement l'hydrolyse des glucosides. Il prit comme test la feuille de Laurier-cerise et constata le dégagement d'acide cyanhydrique avec les hydrocarbures et leurs dérivés (pentane, hexane, CHCl_3 , CCl_4), les alcools (butylique, amylique, propylique), les aldéhydes (cuminique, salicylique) (par contre le formol s'est montré inactif), les cétones (acétone ordinaire), les amines, les amides, etc...

D'un autre côté, HECKEL [122-123-124] obtenait une odeur de coumarine avec certaines plantes (*Melilotus officinalis* L., *Eupatorium triplinerve* Vahl., etc...) ou de vanilline avec des gousses de Vanille soumises à un traitement par des vapeurs anesthésiques (chloroforme ou éther).

(1) Cette faible activité est d'ailleurs toute relative, elle n'est faible que par rapport à ce qu'elle peut devenir dans certaines conditions (en particulier sous l'influence des anesthésiques gazeux).

Un peu plus tard, en 1909, MAQUENNE et DEMOUSSY [149] obtinrent par le même procédé le noircissement des feuilles d'*Aucuba*, le noircissement étant dû à une action diastasique.

En effet, si l'on tue les ferments en plongeant les feuilles dans l'eau bouillante, il n'y a plus de noircissement. Ces mêmes auteurs montrèrent également que les feuilles d'*Aucuba* desséchées dans le vide sulfurique ne noircissait plus sous l'influence du chloroforme : la présence de l'eau est nécessaire.

En 1920, GUÉRIN et GORIS [112] découvrent une nouvelle plante à coumarine : *Melittis Melissophyllum* L., grâce à l'emploi de vapeurs anesthésiques, puis GUÉRIN et LORMAND [113] étudient l'action de faibles doses de chlore, palite, bromacétone, chloropicrine et ypérite (à l'état de vapeurs), sur des feuilles d'*Aucuba* et de Laurier-cerise. Il y eut noircissement de l'*Aucuba* et dégagement d'acide cyanhydrique avec les feuilles de Laurier-cerise ; les feuilles tombèrent ; mais, après un temps plus ou moins long les plantes reprirent leur végétation normale.

La même année, les mêmes auteurs reprirent les expériences de MIRANDE, qu'ils confirmèrent en général, sauf pour quelques corps, en particulier le formol, que MIRANDE avait trouvé inactif. GUÉRIN et LORMAND [114], en procédant sur des feuilles jeunes et sortant les feuilles de l'atmosphère de formol, réussirent à obtenir le noircissement de l'*Aucuba* et le dégagement d'acide cyanhydrique avec les feuilles de Laurier-cerise. Ils montrèrent par contre que l'acroléine, employée à forte dose, était inactive sur l'*Aucuba* et le Laurier-cerise.

L'influence des vapeurs de formol sur les végétaux fut également étudiée par BOKORNY [17-18] au cours de ses travaux classiques sur la formation des glucides.

Enfin, dans le même ordre d'idées, nous citerons certaines méthodes de forçage ayant pour but d'activer le développement d'une plante, l'épanouissement d'une fleur, la germination d'une graine, ou la maturation d'un fruit. Les plantes sont traitées par un agent approprié, généralement sous forme de vapeurs (éther, chloroforme, acétylène, éthylène) à faible dose et pendant un temps assez court puis remises dans des conditions normales. DENNY [85], WEBER [96] préconisent une atmosphère très diluée d'éther ou de chloroforme pendant 24 ou 48 heures. JESENKO [138] donne une autre méthode qui consiste à injecter de l'alcool ou de l'éther fortement dilué. Enfin, rappelons la maturation des citrons, des tomates, des

poires, sous l'influence de vapeurs d'acétylène ou d'éthylène (1).

Nous voyons donc toute l'importance, à de nombreux points de vue, de l'action de certaines substances à l'état de vapeur sur les tissus végétaux et en particulier sur les phénomènes diastasiques *in vivo*. Ces substances volatiles peuvent se ramener à deux types différents ; les unes, comme les anesthésiques (et ce sont les plus nombreuses), provoquent dans certaines conditions une hydrolyse rapides des osides. Sous leur influence, les osides sont plus rapidement dédoublés que dans des conditions normales et que lors de la dessiccation. Ce sont des accélérateurs des réactions diastasiques. Les autres au contraire (formol, acroléine) inhibent ces mêmes réactions.

Quel est le mode d'action de ces différentes substances ? Cette action sur les diastases est-elle la même *in vivo* qu'*in vitro*. Pourquoi certaines substances volatiles provoquent elles une stimulation de l'activité hydrolysante des diastases ?

Dans le cas du chloroforme, GUIGNARD [119], examinant les cellules au microscope, constata de la plasmolyse et rendit ce phénomène responsable du dédoublement diastasique des glucosides. En même temps que la plasmolyse, il y a exolyse et mise en contact du ferment et du glucoside.

La plasmolyse est certainement un fait très important qui explique pour une part les phénomènes observés ; mais est-il le seul qu'on puisse envisager ? A côté de son action incontestable, il y a peut-être autre chose.

Ces expériences nous amènent à envisager les rapports qui peuvent exister entre les modifications chimiques et les modifications d'ordre cytologique. Aussi croyons-nous utile avant de discuter de l'importance de la plasmolyse de rappeler ici les connaissances actuelles sur la structure de la cellule végétale.

Limitée extérieurement par une membrane cellulosique (ce qui la différencie de la cellule animale) la cellule végétale est constituée par une masse de matière vivante : le protoplasme et des inclusions non vivantes représentées d'une part, par les vacuoles (constituant le vacuome) d'autre part, par des inclusions solides comme les graines d'amidon.

La matière vivante fondamentale ou protoplasme comprend elle-même trois éléments : le noyau, le cytoplasme et, dans ce dernier des inclusions dont le rôle dans le métabolisme cellulaire est fondamental : le chondriome. Sous ce nom on doit comprendre à la fois des éléments granuleux ou chondriosomes

(1) A propos de ces études biochimiques du forçage, nous citerons ici les expériences récentes de R. COMBES [78 a] et R. QUETEL [179 a] qui étudièrent chez le Hêtre et le Lilas les variations du métabolisme azoté sous l'influence des vapeurs d'éther.

et des éléments filamenteux ou chondriocotes. Quant aux plastes, considérés par certains auteurs comme correspondant à un ensemble de formations spéciales ou plastidome, ils semblent constitués en réalité, comme l'ont montré de nombreux auteurs et en particulier GUILLIERMOND [120], par des formes évoluées des chondriocotes ou mitochondries.

Au point de vue physico-chimique, le protoplasme peut être considéré comme un complexe colloïdal de protides et de lipides (1) étroitement associés, et d'une solution saline très diluée ; le chondriome diffère chimiquement du cytoplasme par une plus grande teneur en lipides. Quant au noyau, il est particulièrement riche en nucléo-protéides. Le gel protoplasmique contient plus ou moins d'eau « liée » aux complexes lipido-protidiques, cette hydrophilie, dont nous aurons d'ailleurs l'occasion de reparler, étant en rapport avec le coefficient lipocytyque de MAYER et SCHAEFFER (rapport du cholestérol aux acides gras, ou mieux au phosphore lipoidique).

Il nous a semblé intéressant de rappeler ces notions. En effet parmi les substances que nous avons étudiées, les anesthésiques (chloroforme, éther) provoquent non seulement la plasmolyse, mais aussi la destruction du chondriome et des complexes lipido-protidiques. Ce phénomène n'interviendrait-il pas en même temps que la plasmolyse ?

Ainsi, sous l'action des anesthésiques, il y a stimulation de l'activité hydrolysante des ferments *in vivo* et il y a en même temps plasmolyse. Il y a aussi exolyse, mais l'exolysat, provenant vraisemblablement du suc vacuolaire, ne contient pas de diastase ; il contient, par contre, le glucoside. Ainsi que GUIGNARD l'avait déjà dit, c'est le glucoside qui va vers la diastase. Mais, on peut se demander si la diastase, vers laquelle va le glucoside, n'est pas à un état différent de l'état normal et si ce n'est pas lors de la traversée du protoplasme que le glucoside entre en contact avec la diastase libérée de son support de nature inconnue.

La théorie de GUIGNARD reste incontestablement de premier intérêt, mais n'explique pas tous les phénomènes depuis les travaux récents sur la structure cellulaire. De plus, peu d'études quantitatives ont été faites à ce sujet. C'est pourquoi nous avons repris l'étude de ce chapitre de physiologie végétale au point de vue chimique et en corrélation avec le point de vue cytologique.

(1) Ces lipides sont formés de lécithine et de cholestérol en proportions variables.

Cela nous amènera à discuter de l'état sous lequel se trouve la diastase chez le végétal et, accessoirement, de la localisation de ces diastases.

Nous avons limité notre étude (dans le but de pouvoir mieux approfondir la question) à quelques représentants de chacun des deux groupes d'accélérateurs et d'inhibiteurs des réactions diastasiques.

Pour le premier groupe, nous avons pris comme type le chloroforme et l'éther, dont le pouvoir anesthésique est bien connu. Ce sont des substances chimiquement neutres, anhydrophiles, provoquant non seulement la plasmolyse et modifiant la perméabilité des membranes cellulaires, mais encore à dose suffisante détruisant le chondriome et bouleversant le cytoplasme.

Pour le second groupe, nous avons choisi deux aldéhydes volatils, le formol et l'acroléine, solubles dans l'eau, coagulant les protéides, provoquant également la plasmolyse, mais, tout au moins à forte dose, ne détruisant pas le chondriome.

Nous n'avons envisagé ici que l'action de ces corps sur les diastases des glucides ou glucidases, qui sont les mieux connues des hydrolases végétales.

Notre étude a porté à la fois sur des ferments d'hétérosides, ou hétérosidases (rhamnodiastase, myronase et surtout émulsine) et sur des ferments des holosides (amylase, et surtout sucrase). Nous avons fait agir les vapeurs des substances envisagées (chloroforme, éther, formol et acroléine) pendant des temps variables et à des concentrations différentes, sur des feuilles d'*Aucuba*, de Laurier-cerise, de Rue, de Gaulthérie sur des graines de Moutarde, de Rhamnus, sur des Amandes, des Bananes, sur des cellules de levure, sur le mycélium d'*Aspergillus*. Nous avons tenté l'extraction des ferments après traitement, et nous avons apprécié quand cela était possible les variations des holosides et des hétérosides.

Nous avons également envisagé l'action *in vitro* des mêmes substances sur des ferments plus ou moins purifiés et d'origine différente.

Enfin, ces différents points étant acquis, nous discuterons du mécanisme suivant lequel semblent agir *in vivo* et *in vitro* ces accélérateurs et ces inhibiteurs de réactions diastasiques, et nous essaierons d'apporter une contribution à l'étude des diastases dans les tissus vivants.

LES GLUCIDASES.

On désigne sous le nom de glucidases ou encore d'osidases les hydrolases s'attaquant aux glucides. Ces glucidases peuvent elles-mêmes se subdiviser en holosidases et hétérosidases suivant qu'elles agissent sur les holosides ou les hétérosides.

Nous n'étudierons ici que les glucidases d'origine végétale et plus spécialement d'une part, l'émulsine (1) (source de salicoidase, d'amygdaloidase, etc...), la rhamnodiastase, autre complexe fermentaire, et la myronase ; d'autre part, la sucrase, et l'amylase.

Mais auparavant nous voudrions rappeler quelques *propriétés des glucidases*, propriétés auxquelles nous aurons à faire allusion au cours de ce travail.

Comme toutes les diastases, on peut considérer les glucidases comme des catalyseurs de nature colloïdale.

En dehors de cet état colloïdal, elles ont d'autres propriétés communes : elles sont solubles dans l'eau, le glycérol, insolubles dans l'alcool fort, l'éther ; dans certaines conditions, elles sont adsorbables par le kaolin, l'alumine, (on peut séparer ensuite les ferments par élution) et elles ne sont pas dialysables.

Les glucidases sont atténuées, puis détruites, lorsqu'on les soumet à l'action de la chaleur. Au cours des réactions qu'elles conditionnent, elles connaissent une température optimale d'action, variable avec les espèces diastasiques, variable aussi avec les conditions de l'expérience, en particulier avec les corps qui les accompagnent et surtout avec le pH.

Ceci nous amène à parler de l'*influence du pH* sur l'activité diastasique. Ce facteur est en effet d'une importance considérable, il existe pour chaque ferment un optimum de réaction : par exemple, celui-ci est de 4,2 pour la sucrase, de 5 pour la glucosidase β de l'émulsine. Encore faut-il tenir compte de différents facteurs : la température, la durée de l'expérience, l'origine du ferment (la sucrase de levure n'a pas le même pH optimum que la sucrase d'*Aspergillus*), de l'âge, (G. BERTRAND et COMPTON [12]), les impuretés du milieu fermentaire, etc...

(1) On sait que d'après la nouvelle nomenclature la terminaison « ase » doit remplacer la terminaison « ine ». Le mot émulsine devrait donc disparaître et être remplacé par un nom terminé en ase comme synaptase ou amygdalodiastase. Mais en réalité il n'y a pas grand inconvénient à le conserver à condition de se rappeler que le précipité qu'on appelle « émulsine » est en réalité un mélange complexe d'ases.

La composition du milieu fermentaire est également très importante. Certains corps accélèrent les réactions diastasiques, les autres, au contraire, les inhibent. Le mode d'action de ces accélérateurs et de ces inhibiteurs n'est pas toujours très bien connu ; les uns ont une action purement physique (par exemple précipitation des diastases par l'alcool) tandis que les autres agissent par voie chimique. Notons encore que la modification peut porter sur la diastase elle-même (on parlera alors d'activateurs et d'inactivateurs, (ou paralysants) ou sur la réaction (on réservera aux substances agissant de cette manière les noms d'accélérateurs ou d'inhibiteurs). (M. C. ARTON [6]). Ainsi, la chaleur, les sels d'argent dans certaines conditions, sont des inactivateurs de la sucrase, tandis que les sels neutres, les acides aminés, sont des activateurs de l'amylase. Suivant les conditions, la valeur du pH peut être un accélérateur ou un inhibiteur de l'action hydrolysante de l'émulsine. Au cours de ce travail, nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir sur cette notion d'accélérateurs et d'inhibiteurs des réactions diastasiques.

Avant de citer les modes généraux de préparation des glucidases végétales, il nous faut envisager *l'état des diastases dans les tissus vivants* et leur localisation. En réalité, nous savons peu de chose à ce sujet. Certaines diastases (la sucrase de l'*Aspergillus* par exemple) diffusent assez rapidement dans le milieu extérieur ; d'autres, au contraire, pour des raisons qui nous sont encore inconnues (1), restent à l'intérieur des cellules ; c'est ce qu'on appelle des endodiasstases. Pour les obtenir, il faut employer des moyens mécaniques, physiques ou chimiques ; encore cela ne suffit-il pas toujours à les séparer du substrat.

Quant à la localisation, elle est difficile à réaliser, car nous ne possédons pas de réactifs histo-chimiques spécifiques. Pour GUIGNARD [114-115], certaines diastases (émulsine, myrosine) seraient emprisonnées dans des cellules spéciales. Mais il ne semble pas que ce soit là le cas général et, s'il y a, ce qui est indéniable, des cellules riches en diastases, il ne semble pas qu'il y en ait aucune qui en soit intégralement privée. D'autre part, on ne sait si les diastases sont intimement unies à l'hy-

(1) Le fait qu'une diastase ne diffuse pas peut tenir simplement à l'imperméabilité cellulaire, mais nous verrons que dans la plupart des cas le ferment est retenu par certaines adhérences, généralement de nature physico-chimique.

drogel protoplasmique ou sont portées des plastes ou par des mitochondries [78-120]. Nous reviendrons sur toutes ces questions dont nous discuterons à propos de l'interprétation de nos expériences.

Comme source de diastases, on emploie des organes végétaux riches en ferments (généralement des graines ou des fruits) ou des végétaux inférieurs (levures, moisissures). On extrait les diastases par macération dans un solvant approprié (eau, glycérine). Cette macération est précédée ou non d'un broyage, d'une dessiccation, d'une autolyse ; on purifie ensuite par dialyse, par précipitation (alcool, acétone, sels neutres), par adsorption. On obtient ainsi non pas les ferments eux-mêmes, mais des complexes riches en ferments.

Nous ne connaissons encore que quelques aspects de la constitution chimique des diastases, le fait par exemple qu'elles comportent une complémentaire active et une complémentaire activante (G. BERTRAND). Mais leur structure intime nous échappe. On a cependant rattaché récemment aux protides des diastases qui sont elles-mêmes des diastases des protéides ou de leurs dérivés (pepsine, trypsine, uréase) et qui d'ailleurs ne rentrent pas dans le cadre de cette étude.

A propos de la constitution des ferments, deux théories se sont affrontées : celle de la « diastase substance » et celle de la « diastase propriété », suivant laquelle il y aurait non pas des diastases de composition différente, mais une fonction diastasique. Jusqu'ici il n'y a aucune raison d'admettre l'existence d'une fonction diastasique liée à la présence d'un groupement chimique défini et le même partout. Il est probable que les ferments sont de nature chimique très variable. Tout ce que nous savons se réduit à ceci : les ferments sont des corps de poids moléculaire élevé, donnant non des solutions vraies, mais des hydrosols. On admet qu'ils sont constitués par un substratum colloïdal sur lequel se fixe un groupe chimique actif (G. BERTRAND, WILLSTAETTER [199]) ; en ce qui concerne les glucidases, la nature du substratum et celle du groupe actif, sans doute variables suivant les diastases, nous sont encore inconnues.

Il nous reste à parler brièvement des réactions diastasiques, de leur spécificité, de leur réversibilité et des lois qui les régissent.

Nous avons vu que les diastases se comportaient comme des catalyseurs chimiques ; cependant elles en diffèrent par

certaines particularités ; entre autres, elles n'exercent leur action que sur un petit nombre de corps présentant entre eux certains caractères communs : les diastases sont donc spécifiques. Nous ne discuterons pas ici de la théorie de la spécificité fermentaire, ce qui serait sortir du cadre de ce travail ; nous rappellerons simplement qu'il existe de nombreuses méthodes pour s'assurer de la spécificité d'une diastase [méthode comparative ; méthode de l'optimum, méthode d'absorption sélective, de destruction partielle (que nous étudierons en détail à propos de l'action du formol sur les différentes glucidases de l'émulsine), méthode des vitesses de réactions, etc...].

Les actions diastasiques étant des actions catalytiques, on peut se demander si elles obéissent aux lois générales de la chimie — s'il y a des différences entre l'hydrolyse acide et l'hydrolyse diastasique.

La réaction la mieux étudiée à ce point de vue est l'hydrolyse du saccharose, qui peut être considérée comme une réaction monomoléculaire.

Lors de l'inversion par la sucrase on voit que la vitesse n'est qu'exceptionnellement proportionnelle à la teneur en saccharose.

COLIN et CHAUDUN [75] ont établi que la différence essentielle avec l'hydrolyse acide réside en ceci que l'allure du phénomène biochimique dépend, non des concentrations propres en sucre et en diastase, mais du rapport $\frac{a}{n}$ de ces concentrations, la réaction obéissant ou non à la loi de WILHELMY, ($V = f(t)$ est une courbe logarithmique dans le cas de l'hydrolyse acide), suivant que le quotient $\frac{a}{n}$ est inférieur ou supérieur à une limite déterminée caractéristique de la solution diastasique (1).

Ces résultats sont valables pour d'autres glucidases. Les mêmes lois s'appliquent à l'hydrolyse par l'émulsine du salicoside ou du β méthylglucoside, mais il n'en est plus de même avec l'amygdalosite, dont l'hydrolyse exige l'intervention de deux ferments (amygdalase et amygdalinase (BERTRAND et COMPTON [12] ; JAVILLIER [137] ; GIAJA [103], et lors de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase.

Nous n'avons parlé jusqu'ici que de l'hydrolyse diastasique. Mais, il y a aussi des réactions diastasiques à caractère syn-

(1) Nous reviendrons sur ce sujet à propos de l'action du formol sur les glucidases *in vitro*,

thétique et cela nous amène à la question de la *réversibilité fermentaire*.

Cette idée fut développée dès 1892 par TAMMANN mais c'est à CROFT HILL que revient le mérite d'avoir effectué la première synthèse biochimique. Etudiant le dédoublement du maltose par le macéré de levure, il remarqua que l'hydrolyse n'était pas complète et qu'on aboutissait à un équilibre. Il eut donc l'idée de faire agir un macéré de levure basse (source de maltase) sur une solution de glucose. Il obtint un bioside, produit de condensation du glucose, qu'il appela revertose. Puis vinrent en 1912 les remarquables travaux de BOURQUELOT et ses élèves qui réalisèrent de nombreuses synthèses biochimiques d'hétérosides d'alcool et d'holosides (gentiobiose, cellose, etc...) [30-31-32-39-40-41-42].

C'est après avoir constaté que le salicoside était hydrolysé par l'émulsine en milieu alcoolique, bien que le ferment soit insoluble dans ce milieu, que BOURQUELOT et BRIDEL furent conduits à la synthèse de l'éthylglucoside β et à la réversibilité fermentaire. Est-ce la même diastase qui intervient dans la synthèse et l'hydrolyse ? Dans ce cas de l'émulsine, il semble qu'il en soit ainsi. En effet, BOURQUELOT a montré que, toutes choses égales d'ailleurs, la limite atteinte est commune aux deux actions synthétisante et hydrolysante. Cette limite dépend entre autres facteurs de la concentration en glucose (1) et en alcool ; elle correspond à une hydrolyse plus forte et à une synthèse moindre au fur et à mesure que l'alcool est plus dilué. Quant à la quantité d'émulsine, elle influe uniquement sur la vitesse de réaction mais non sur l'équilibre final. Donc dans certaines conditions les glucidases peuvent devenir synthétisantes. En est-il de même *in vivo* ? C'est ce qu'il est permis de supposer à la lumière des expériences sur la réversibilité fermentaire. On peut cependant invoquer quelques faits contre cette réversibilité fermentaire ; ainsi il faut bien admettre que certaines réactions diastasiques sont totales et n'aboutissent pas à un équilibre. Néanmoins cette doctrine a mis en évidence ce fait que, dans certains cas les diastases sont capa-

(1) J. RABATÉ [181] étudiant les ases de la poudre fermentaire de *Salix purpurea* a pu montrer que la forme du glucose pouvait modifier l'état d'équilibre. Ainsi avec le glucose naissant (provenant de l'hydrolyse d'un hétéroside) on peut avoir une synthèse beaucoup plus importante qu'avec le glucose ordinaire. Cette expérience permet d'expliquer la synthèse d'hétérosides d'alcool chez les végétaux (en particulier celle des hétérosides cyanogénétiques).

bles non seulement de provoquer l'hydrolyse mais aussi d'effectuer la synthèse de principes immédiats chez les végétaux, et si cette synthèse ne permet peut être pas d'interpréter tous les phénomènes du chimisme vital (COLIN [72]), tout au moins les diastases conditionnent-elles pour une grande partie le métabolisme cellulaire. A la lumière de nos expériences, nous aurons d'ailleurs l'occasion de discuter de l'action hydrolysante et synthétisante des glucidases *in vivo*.

Nous dirons maintenant quelques mots des glucidases étudiées au cours de ce travail.

L'ÉMULSINE.

L'émulsine est un extrait fermentaire isolé des amandes en 1837 par LIEBIG et WÖHLER [202], puis étudiée en 1838 par ROBIQUET [183] qui l'appela synaptase.

Après ces premières recherches, on croyait que l'émulsine était un principe défini n'agissant que sur l'amygdaline et spécial aux amandes. Des recherches ultérieures ont montré que l'émulsine était en réalité un mélange de ferments (BOURQUELOT [35], dont la liste est aujourd'hui très longue, et qu'elle existe chez de nombreux végétaux.

BOURQUELOT signala sa présence chez les champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*) [24-25]. HÉRISSEY en trouva chez les Mousses et en décela chez de nombreux Phanérogames (*Prunus Lauro-Cerasus*, *Vicia*, *Linum*, *Phaseolus*, etc., [131]).

Récemment on a pu retirer de l'émulsine des noyaux de Cereise [127] et de Mandarine, des fèves de Soja, des graines de Luzerne, des fruits de l'Eglantier [135] etc.

Il faut noter d'ailleurs que tous ces ferments végétaux, s'ils renferment de la glucosidase β , ne sont cependant pas identiques à l'émulsine d'amandes au point de vue des différents ferments qu'ils renferment, de leur vitesse de réaction, etc. Nous citerons à ce sujet l'étude de l'émulsine d'*Aspergillus* et sa comparaison avec l'émulsine d'amandes par M. H. HÉRISSEY [131]. L'émulsine n'est donc pas une substance définie, mais un complexe fermentaire capable de dédoubler le glucoside β et, en particulier, certains glucosides cyanogénétiques.

Parmi les nombreux ferments (glucidases, protéases, lipase) signalés dans l'émulsine d'amandes et dont la liste s'allonge presque chaque année, nous ne parlerons ici que des glucidases.

Parmi celles-ci il faut distinguer des *holosidases* (amygdalase, invertase, gentiobiase, lactase, cellobiase, mélibiase, manni-notriase, vicianase, primevérase) et des *hétérosidases* qui sont les plus importantes. En effet en dehors des hétérosides cyanogénétiques (amygdaloside, prulaurososide) l'émulsine dédouble de nombreux β glucosides lévogyres en donnant du *d*-glucose et un aglycone de nature variable, tels sont par exemple l'aucuboside, l'arbutoside, le salicoside, le β méthylglucoside, etc.

Elle contient en outre une galactosidase β , un xylosidase β LANGLOIS [142], une primevérosidase, un mannosidase α et une arabinosidase α .

D'autre part, l'émulsine est capable de réaliser, non seulement l'hydrolyse d'holosides et d'hétérosides, mais aussi la synthèse de certains de ces holosides ou hétérosides.

En milieu alcoolique, BOURQUELOT et BRIDEL ont pu préparer par voie biochimique de nombreux β glucosides d'alcool (méthyl, éthylglucosides β , etc.). Dans des conditions comparables, BOURQUELOT, HÉRISSEY et BRIDEL ont réalisé la synthèse de nombreux galactosides d'alcools, de biosides tels que le gentiobiose et le cellobiose.

D'après ces auteurs, le ferment synthétisant est identique au ferment hydrolysant, et on se trouve en présence de réactions réversibles.

Après celles de CROFT HILL, ces expériences ont montré de façon définitive les propriétés synthétisantes des glucidases. Notons cependant que, si on a pu jusqu'ici réaliser la synthèse biochimique de glucosides d'alcools, il n'en a pas été de même des glucosides de phénols, pourtant très abondants chez les végétaux.

BOURQUELOT et HÉRISSEY [40] en faisant agir, en présence d'émulsine, le glucose sur le saligénol en milieu acétonique ont obtenu, non pas le salicoside, mais un isomère le salicylglucoside.

Peut être, comme le suggère M. A. GORIS [105] arrivera-t-on en modifiant les conditions opératoires à réaliser *in vitro* la synthèse de nombreux holosides et hétérosides existant chez les végétaux. Quant à la synthèse *in vivo* de ces mêmes principes tributaires de l'émulsine, nous n'en parlerons que lors de nos conclusions, puisque cette question constitue une partie de notre travail.

PRÉPARATION. — L'émulsine que nous avons employée a été préparée à partir d'amandes douces suivant la technique clas-

sique de H. HÉRISSEY [131]. Les amandes mondées sont broyées, puis mises à macérer dans l'eau ; on élimine la caséine par l'acide acétique, on précipite le ferment par addition d'alcool au filtrat (nous ne donnons pas ici le détail de la technique et nous ne parlons pas de la purification de l'émulsine car nous y reviendrons longuement lors de notre étude de l'émulsine *in vitro*). On pourrait également employer comme matière première le tourteau d'amande amère (BRIDEL et Mlle DESMAREST [56]).

CARACTÈRES ET COMPOSITION. — L'émulsine ainsi obtenue est une poudre blanc-jaunâtre donnant avec l'eau un liquide opalescent. Cette solution précipite par le tanin, le sublimé, le sous-acétate de plomb.

La constitution chimique de l'émulsine est inconnue ; elle contient du soufre, donne les réactions des protides (1) et des glucides (ceux-ci, entre autres produits, donnent par hydrolyse de l'arabinose (HÉRISSEY [131])). L'émulsine est détruite par la pepsine, mais non par la trypsine, la phosphatase, et la nucléase (HELPERICH [127-128]). Elle est également détruite par méthylation ou acétylation (HELPERICH [128]).

Conditions d'action. — Comme toutes les diastases, l'émulsine est détruite par la chaleur ; d'après BOURQUELOT la température mortelle est entre 67 et 69° (si l'on se place au point de vue de la glucosidase β), l'optimum de température étant aux environs de 50° (G. BERTRAND [11]). Son pH optimum varie suivant l'hétéroside envisagé, il est compris entre 4,5 et 5,3 (OPPENHEIMER [168]).

L'activité diminue si le pH est inférieur à 4 ou supérieur à 8 (HELPERICH [128]).

A l'abri de la lumière et surtout de l'humidité, l'émulsine conserve très longtemps ses propriétés (BRIDEL [55]). Cependant les différentes diastases sont inégalement résistantes ; G. BERTRAND et COMPTON [12] ont signalé chez une émulsine préparée depuis quatre ans une diminution de l'activité vis-à-vis de l'amygdaloside. BRIDEL et Mlle DESMAREST [55] ont observé chez une émulsine préparée depuis 8 ans une disparition de la sucrase et une diminution d'activité de la lactase.

Enfin, nous rappellerons que l'émulsine a été employée par BOURQUELOT [26, 27, 28] pour la recherche, l'identification, et

(1) L'émulsine contient des acides aminés et en particulier du tryptophane (HELPERICH [130]).

le dosage des hétérosides chez les végétaux. C'est d'ailleurs grâce à la méthode biochimique de BOURQUELOT que nous avons suivi les variations d'hétérosides tributaires de l'émulsine chez des végétaux soumis aux vapeurs de différents corps organiques (chloroforme, éther, formol, acroléine). Nous décrirons cette méthode lors de l'exposé des techniques employées au cours de ce travail.

LA RHAMNODIASTASE.

La rhamnodiastase est également un complexe fermentaire, retiré des graines de divers *Rhamnus* et en particulier de *Rhamnus utilis*. Signalé par STEIN [188] ce complexe fut surtout utilisé comme produit fermentaire par C. et G. TANRET [191]. Mais il fut surtout étudié par BRIDEL et CHARAUX [53]. Ces auteurs donnèrent un mode de préparation de cet extrait fermentaire à partir du *Rhamnus utilis* : les graines broyées, tamisées et dégraissées sont mises à macérer dans de l'eau distillée ; après expression et filtration, on ajoute au liquide obtenu de l'alcool en quantité suffisante, et on recueille le précipité obtenu.

On obtient ainsi une poudre jaune brunâtre, capable d'hydrolyser de nombreux hétérosides, non attaquables par l'émulsine, tels que les primevérosides, les rutinoides, les vicianosides, le rhamnicoside, le robinoside. Ces corps, tributaires de la rhamnodiastase, renferment en dehors de l'aglycone non plus un seul ose, mais un holoside complexe formé de deux ou trois oses (le primevérose, le rutinoside, le vicianoside sont des biosides, le rhamninoside et le robinoside des triosides) et la rhamnodiastase hydrolyse l'hétéroside sans toucher à l'holoside.

BRIDEL et CHARAUX [54] ont pu mettre au point une méthode biochimique à la rhamnodiastase, calquée sur la méthode à l'émulsine de BOURQUELOT, permettant de rechercher et même de doser les hétérosides tributaires de ce ferment.

LA MYROSINE.

La myrosine est le ferment hydrolysant les hétérosides sulfurés qu'on trouve dans diverses familles (Crucifères, Tropéolées, Capparidacées, Résédacées) et elle n'existe que chez les

plantes à glucosides sulfurés. Ni les levures, ni les moisissures, n'en renferment la moindre trace.

L'action de la myrosine est limitée aux glucosides à sénévol, elle ne touche pas aux thiobiosides de synthèse. D'après certains auteurs, elle serait composée de deux diastases : une sulfatase et une thioglucosidase [73].

On la prépare à partir de la Moutarde blanche (GUIGNARD [116]) par macération aqueuse, élimination du mucilage par l'alcool faible et précipitation du ferment par l'alcool fort. Le précipité est lavé à l'alcool puis à l'éther.

On obtient ainsi un extrait fermentaire, sans action sur les glucosides β , tributaires de l'invertine, mais contenant des traces de sucrase. Il hydrolyse les hétérosides sulfurés tels que le sinigroside de la Moutarde noire, le sinalboside de la Moutarde blanche, le cheiroloside de la Giroflée, les hétérosides du *Cochlearia*, du Cresson et de la Capucine.

En 1910, un élève de BOURQUELOT, VINTILESCO [194] a proposé une méthode biochimique à la myrosine pour la recherche des hétérosides sulfurés. Nous avons essayé d'appliquer cette méthode au dosage de ces mêmes hétérosides et nous verrons que nous nous sommes heurtés à certains difficultés.

L'INVERTINE OU SUCRASE.

L'invertine encore appelée sucrase, saccharase, invertase, est la glucidase hydrolysant le saccharose, le plus commun des sucres et un des premiers produits de l'assimilation chlorophyllienne. L'invertine existe en abondance chez les levures, les moisissures (elle est par contre assez rare chez les Champignons supérieurs) et chez tous les Phanérogames.

PRÉPARATION. — La préparation de l'invertine est simple. On emploie généralement comme matière première la levure de boulangerie. L'invertine que nous avons employée était préparée selon le procédé de BOURQUELOT [28] ; la levure fraîche de boulangerie (marque Springer) est délayée au mortier dans de l'alcool à 95°. On laisse en contact 24 heures, onessore sur un filtre de Büchner, on lave à l'alcool puis à l'éther, enfin on dessèche dans le vide sulfurique.

On peut également utiliser comme source de sucrase un macéré de levure en milieu antiseptique, ou encore abandonner

la levure à la putréfaction, l'autolyse est alors plus rapide, on y met fin avant que la réaction ne soit devenue alcaline (COLIN [70-73]).

L'optimum de température de la sucrase de levure est aux environs de 35°, la réaction qui convient le mieux est celle qui correspond à $\text{pH} = 5$.

La constitution chimique est inconnue, bien qu'ayant fait l'objet de nombreux travaux [163-202]. Certains réactifs des aldéhydes (aniline, *p*-phénylènediamine) se montrant toxique pour l'invertine, certains auteurs et en particulier MYRBÄCH en avaient déduit que le groupement actif de l'invertine était une fonction aldéhydique. On peut objecter à cela que d'autres réactifs des aldéhydes (HCN, bisulfite) se montrent inoffensifs ou presque.

Avec les métaux lourds (plomb, argent) l'invertine forme des complexes inactifs. Le phénomène est réversible, il suffit d'éliminer le métal pour faire réapparaître les propriétés du ferment. Elle aurait en outre un groupement basique d'après la façon dont elle se comporte vis-à-vis de l'acide picrique et des réactifs des alcaloïdes.

Quant à l'état de la sucrase dans la cellule de levure il a été étudié par de nombreux auteurs. On sait en effet que la levure de bière non traumatisée ne cède pas son invertine à l'eau ; pour obtenir ce résultat il faut avoir recours à divers traitements mécaniques ou physiques (OPPENHEIMER [168]).

D'après WILLSTAETTER, le ferment est associé à des combinaisons organiques de poids moléculaire élevé et il est nécessaire de détruire ce complexe pour libérer la sucrase. Le ferment serait mélangé à des glucides complexes, l'adsorbant serait de nature hydrocarbonée ; en effet la sucrase est libérée, non pas après action des ferments protéolytiques, mais par action de l'extrait de malt (WILLSTAETTER et RACKE [201]). Nous reviendrons d'ailleurs sur ces expériences lors de notre étude de l'invertine.

SPÉCIFICITÉ. — Jusqu'à ces dernières années on croyait que l'invertine de levure ne contenait qu'un seul ferment hydrolysant le saccharose libre ou combiné (gentianose, raffinose, stachyose, verbascose) et spécifique de la liaison glucose-fructose.

La liste des holosides dédoublables par l'invertine ne comptait que des holosides auquel le ferment enlevait une molécule de fructose.

A la suite de COLIN [71] et de ses collaborateurs AUGEM [8], DE CUGNAC [81], NEYRON [164], RICARD [77-182], on remarqua que l'invertine agissait sur d'autres sucres, en particulier sur des fructosides (synanthroholoside ou synanthrine, hélianthénholoside, etc.) et même sur un glucoholoside (le laminaroholoside ou laminarine) l'invertine serait donc, comme l'émulsine, un mélange de ferments (sucrase, fructosidase, laminarosidase). Nous verrons d'ailleurs à propos de l'étude de l'invertine *in vivo* que dans la plupart des cas cela n'altère en rien la valeur de la méthode biochimique à l'invertine.

A la suite des travaux de CROFT HILL sur la réversibilité de la maltase, de BOURQUELOT sur la réversibilité de l'émulsine, on essaya de réaliser la synthèse biochimique du saccharose à l'aide de l'invertine ; ces essais furent infructueux. A la suite des travaux récents de l'école anglaise sur la structure des oses et des holosides, BRIDEL [51] put expliquer la cause de ces échecs : le fructose du saccharose n'est pas le fructose stable ordinaire à noyau pyranique et pont d'oxygène en 2-6, mais le fructose instable furanique à pont d'oxygène en 2-5. Libéré du saccharose par hydrolyse acide ou fermentaire le fructose instable se transforme rapidement en fructose stable. C'est pourquoi il était impossible de réaliser la synthèse biochimique du saccharose à partir du fructose stable.

Pour réaliser cette synthèse il faut donc recourir à un artifice permettant de travailler avec un dérivé stable du fructofuranose.

OPARIN et KURSSANOW [167] semblent avoir réalisé cette synthèse d'une manière élégante en faisant réagir en présence de sucrase le glucose sur le fructose furanique stabilisé à l'état d'ester orthophosphorique. Comme le fait remarquer COURTOIS [79], il se peut d'ailleurs que le saccharose se forme chez les végétaux par un mécanisme analogue. Nous en discuterons lors de notre étude de l'invertine *in vivo*.

LA MALTASE.

C'est un ferment, très répandu dans le règne végétal, transformant le maltose (1) en deux molécules de glucose. On peut

(1) La maltase étant un α glucosido-glucose, la maltase est une diastase α .

préparer la maltase à partir de levures, de moisissures (*Aspergillus*, *Mucor*) de Graminées (Maïs). Ces différentes maltases sont inégalement résistantes ; tandis que la maltase de *Mucor* se conserve facilement, la maltase de la levure est beaucoup plus fragile, elle est détruite par l'alcool fort. C'est pourquoi la sucrase, préparée suivant la méthode de BOURQUELOT [38], ne renferme pas de maltase, il en est de même des autolysats préparés par putréfaction ménagée de la levure. La maltase que nous avons étudiée *in vitro* est celle de l'*Aspergillus niger*.

Récemment R. FRANQUET [100] et A. MEUNIER [157] ont recherché le maltose dans les végétaux à l'aide de la méthode biochimique en prenant comme source de maltase la pancréatine suivant le procédé proposé par Mlle BOURDOUIL [22].

LA TRÉHALASE.

La tréhalase est très répandue chez les champignons (BOURQUELOT [24]) ; on y trouve le bioside qui lui correspond : le trehalose ou $\alpha\alpha$ glucosido-glucose (comme la maltase, la tréhalase est une diastase α).

La recherche du trehalose peut être effectuée à l'aide de la méthode biochimique à la tréhalase préconisée par HARANG [121] qui employait comme source de tréhalase le mycelium d'*Aspergillus niger*. C'est également ce produit que nous avons employé, au cours de nos expériences.

L'AMYLASE.

L'amylase fut la première diastase connue — elle fut isolée en 1833 de l'Orge germé par PAYEN et PERSOZ [170]. On la trouve chez les moisissures, les levures, les différents organes des plantes chlorophylliennes — chez les graines elle est particulièrement abondante au moment de la germination.

On la prépare généralement à partir du malt broyé puis mis à macérer dans l'eau. On ajoute de l'alcool au filtrat. On recueille le précipité qu'on lave à l'alcool et à l'éther. L'amylase transforme l'amidon (employé sous forme d'empois) en maltose, en passant par des produits intermédiaires peu connus qu'on appelle dextrines, et qui se colorent différemment avec l'iode (amylo, érythro, achrodextrines). Cette transformation

n'est pas intégrale, il reste des dextrines, qualifiées par Du-CLAUX de résiduelles, elle devient complète en présence d'extrait de levure, jouant le rôle de coferment (PRINGSHEIM et FUCHS [177]).

On peut considérer l'amylase comme un complexe de deux ferments : l'un liquéfiant (amylase) dont la température optimum est 75° ; l'autre saccharifiant (amylopectinase) dont l'optimum est à 65°, qui est détruit par chauffage de quelques minutes à 70° (BOURQUELOT [23]).

D'après OHLSON [165], cette hypothèse n'est pas tout à fait exacte, car ces deux enzymes peuvent attaquer directement l'amidon — d'après cet auteur il y aurait deux sortes d'amylases : une α amylase ou dextrinogénamylase, non détruite à 70° ayant le pouvoir de transformer l'amidon en produits non colorables par l'iode et donnant de l' α maltose — et une β amylase ou saccharogénamylase détruite à 70°, donnant des produits colorables par l'iode, puis du β maltose.

Certaines Graminées (Orge, Blé, Seigle, Avoine) produisent à la fois de l' α et de la β amylase, tandis que d'autres (Maïs, Riz) ne produiraient que de l' α amylase.

Signalons enfin l'existence d'une méthode biochimique à l'amylase (Mlle BOURDOUIL [22] permettant de doser l'amidon chez les végétaux, et que nous décrirons en détail à propos de l'étude de l'amylase *in vivo*.

PREMIÈRE PARTIE.

A. — Étude de l'émulsine « in vivo ».

CHAPITRE I.

Choix du matériel d'étude. Principe des dosages.

Nous nous sommes adressé à différents organes végétaux contenant de l'émulsine, et nous avons fait agir les vapeurs de chloroforme, d'éther, de formol ou d'acroléine à différentes concentrations et pendant des temps variables. Pour juger des effets obtenus sur les actions diastasiques, nous avons, d'une part, dosé la quantité d'hétérosides dans les lots traités par les substances organiques volatiles et dans les lots témoins, d'autre part, nous avons tenté d'obtenir les diastases à l'état de poudre ou d'extrait fermentaire, en tenant compte de la quantité des produits obtenus, toujours par rapport à des témoins.

Nos expériences ont porté sur les feuilles d'*Aucuba* et de Laurier-cerise, de composition chimique bien connue, et faciles à se procurer. Ces feuilles présentent encore d'autres avantages : on peut suivre facilement le dédoublement de l'hétéroside, se traduisant par un noircissement chez l'*Aucuba*, et par un dégagement d'acide cyanhydrique chez le Laurier-cerise. C'est pourquoi ces feuilles ont déjà été employées, dans des expériences qualitatives, comme test de dédoublement glucosidique. Enfin, après hydrolyse, on peut doser non seulement les sucres formés mais encore les produits de dédoublement non

glucidiques (dosage pondéral de l'aucubigénol, ou dosage volumétrique de l'acide cyanhydrique, dont nous donnerons plus loin les techniques détaillées).

L'étude de la variation des hétérosides, tributaires de l'émulsine, sous l'influence des vapeurs étudiées a été possible grâce à la *méthode biochimique* de BOURQUELOT [26-27-28], qui a déjà rendu de si grands services en physiologie végétale, en permettant non seulement de découvrir de nombreux hétérosides ou holosides, mais encore de doser ces mêmes principes, à différents moments de la végétation par exemple.

Nous ne donnerons pas ici l'historique de cette méthode, instituée dès 1901, et maintenant classique ; d'ailleurs nous décrirons, à propos des feuilles d'*Aucuba* et à titre d'exemple, une de nos expériences en détail ; nous rappellerons simplement le principe de ces dosages biochimiques.

La méthode biochimique comprend deux parties :

1° l'obtention d'une liqueur contenant les glucides de la plante ;

2° l'essai biochimique proprement dit ou dosage des glucides à l'aide de ferments.

L'obtention de la liqueur extractive doit être précédée d'une stabilisation. On projette donc la plante fraîche dans de l'alcool bouillant qui tue les ferments et dissout les glucides. On fait une deuxième extraction à l'alcool après avoir divisé le végétal. Les colatures sont évaporées à sec sous pression réduite, l'extract sec est repris par l'eau bouillante, on filtre la solution obtenue qu'on amène à un volume déterminé. Dans certains cas, il peut être intéressant de dégraisser cette liqueur à l'éther (CHARAUX [63], RABATÉ [181]).

On fait ensuite agir sur cette solution, contenant la totalité des glucides solubles de la plante, l'invertine, puis l'émulsine et on note les changements de déviation et la teneur en sucre réducteur. Il faut faire agir l'invertine avant l'émulsine, car celle-ci contient de la sucrase ; comme, d'autre part, les liqueurs contiennent le plus souvent du saccharose, il importe de se débarrasser de ce sucre avant de faire agir l'émulsine. Après avoir déterminé les variations du pouvoir réducteur et du pouvoir rotatoire on peut calculer l'*indice de réduction enzymolytique* de BOURQUELOT [27]. « C'est le nombre de milligrammes de sucre réducteur, exprimé en glucose, formé dans 100 cm³ de solution, sous l'influence du ferment employé (émulsine, invertine, etc.) pour un changement de 1°, observé au tube de 2

dm. ». Cet indice est une constante qui permet de caractériser un oside. Il est évident que, s'il y avait chez une même plante, non plus un seul, mais plusieurs osides tributaires du même ferment, ce calcul ne conviendrait plus, et la méthode biochimique ne pourrait plus servir dans ce cas à doser ou à caractériser les osides.

Signalons enfin que la méthode de BOURQUELOT à l'émulsine a été étendue à d'autres glucidases (tréhalase, rhamnodiastase, myrosine, amylase) ; nous en reparlerons lors de l'étude de ces ferments.

Calcul des résultats.

Sauf indications contraires, tous nos examens polarimétriques ont été effectués au tube de 20 cm. ($l = 2$ dm.) à une température de 20° à l'aide d'un polarimètre avec lampe à vapeur de sodium ($\lambda = 5893 \text{ \AA}$) permettant d'apprécier des variations de $2'$. Les résultats, exprimés en degrés et minutes d'arc, ont été ramenés à 100 g. de plante fraîche.

Le dosage des matières réductrices est effectué selon la méthode précise de G. BERTRAND [13] trop connue pour que nous la décrivions ici ; les sucres réducteurs (S.R.) sont exprimés en mg. de glucose pour 100 cm³ de solution représentant 100 g. de plante fraîche.

Nous décrivons successivement les expériences faites sur les feuilles d'*Aucuba*, puis sur les feuilles de Laurier-cerise.

CHAPITRE II.

Expériences sur les feuilles d'*Aucuba Japonica* Thunb (Cornacées).

L'*Aucuba japonica* est un arbuste ornemental, dont il existe plusieurs variétés ayant d'ailleurs sensiblement la même composition chimique (LEBAS [143]). Nos feuilles provenaient toutes des jardins de l'Hôpital Lariboisière. Elles étaient panachées et dentées ; et appartenaient à la variété *crotonifolia*. La composition chimique a été étudiée par BOURQUELOT et HÉRISSEY [34-36] qui ont extrait, d'abord des graines, puis des feuilles, un glucoside β , l'aucuboside (aucubine) se présentant en cristaux incolores, lévogyres ($[\alpha]_D = -173^\circ 1$), solubles dans l'eau et l'alcool chaud. Son indice de réduction enzymolytique, selon BOURQUELOT, est de 144. La structure chimique a été étudiée en 1928 par KARIYONE et KONDO [140]. Signalons que cet hétéroside a été retrouvé par la suite dans de nombreux végétaux dont le noircissement est dû à l'hydrolyse de l'aucubine. Tels sont entre autres le Plantain (BOURDIER [20]) les Melampyres (Mlle BRÆCKE) [44], le *Rhinanthus Crista-Galli* L. (Mlle BRÆCKE [45]) et le *Lathrœa clandestina* L. (BRIDEL [50]).

Sous l'influence des acides ou de l'émulsine, il y a formation de glucose et d'aucubigénol. Ce corps est incolore au moment où il se forme, puis, par polymérisation, il donne naissance à un composé noir. Ce précipité se forme lentement à froid avec l'émulsine ; par contre, à chaud et en milieu acide, il se forme rapidement ; la réaction devient quantitative et peut servir à un dosage pondéral (LEBAS [144]). C'est pourquoi les solutions d'aucuboside, sous l'influence de l'émulsine et des acides, même à froid, deviennent jaune verdâtre puis noirâtres. Signalons enfin que l'aucubigénol n'est pas optiquement inactif et qu'il est légèrement réducteur ; de plus il n'est pas éliminé par défécation au plomb ; aussi BOURQUELOT et HÉRISSEY [36] recommandent-ils, quand on veut déterminer la valeur de l'hydrolyse de l'aucuboside par la méthode biochimique

que à l'émulsine, de chauffer la liqueur au bain-marie bouillant pendant 30 minutes (pour précipiter complètement l'aubigénol) avant de faire l'examen polarimétrique et la détermination des sucres réducteurs.

Nous avons donc étudié quantitativement l'action des vapeurs de chloroforme, d'éther, de formol ou d'acroléine à différentes doses et pendant des temps variables. Pour avoir une idée de l'activation ou de l'inhibition de l'émulsine *in vivo*, nous avons dosé les hétérosides après action des substances envisagées et nous avons comparé aux résultats obtenus avec des témoins.

Dans tous les cas, la technique employée a été la même, c'est pourquoi nous allons la décrire une fois pour toutes.

Détail d'une expérience :

Il importe tout d'abord de partir de lots homogènes. Nous avons toujours pris soin d'employer des feuilles récoltées dans les mêmes conditions (le matin de préférence), de même âge, de même grandeur, n'ayant subi aucun traumatisme. On a ainsi des lots aussi comparables entre eux que possible. L'un de ceux-ci est soumis au traitement par les vapeurs pendant un temps déterminé, le lot témoin est laissé sous une cloche (1). Les deux lots sont stabilisés en même temps. Nous avons fait en général des lots de 100 grammes.

1. *Obtention des liqueurs extractives.* — Les feuilles étaient projetées entières dans un litre d'alcool à 80° bouillant. Après une demi-heure d'épuisement au réfrigérant à reflux, on filtre la colature obtenue. Les feuilles séchées sont broyées puis épuisées une deuxième fois pendant 1 heure par un litre d'alcool à 80°. Cette seconde liqueur est ajoutée à la première. Nous nous sommes assuré que ces deux épuisements étaient suffisants ; en effet un troisième traitement n'enlève plus de quantités appréciables de glucides au marc. Nous avons constaté de plus qu'il n'était pas nécessaire de broyer les feuilles entre le premier et le deuxième épuisement. Nous n'avons pas ajouté de carbonate de calcium lors de la stabilisation, les liqueurs obtenues étant sensiblement neutres, et par conséquent les risques d'hydrolyse éliminés (COLIN et BELVAL [74]).

(1) Et non à l'air libre, ce qui fausserait les résultats. D'ailleurs on ne peut se contenter d'un seul lot initial comme point de comparaison, car la composition chimique des feuilles abandonnées à elles-mêmes se modifie rapidement.

2. *Concentration.* — Les liqueurs alcooliques sont évaporées en consistance d'extrait sec sous pression réduite sans dépasser une température de 50-60°.

3. L'extrait sec est repris par l'eau bouillante à plusieurs reprises. La solution, filtrée sur papier, est amenée à un volume égal en cm^3 au poids en grammes de la plante, soit 100 cm^3 pour 100 g.. On ajoute un peu de toluène à la solution aqueuse afin d'éviter le développement des microorganismes. On détermine alors le pouvoir réducteur et la déviation polarimétrique : la liqueur, préalablement chauffée au bain-marie pour éliminer l'aucubigénol, est déféquée de la façon suivante : 25 cm^3 de la liqueur, mesurés à la pipette, sont introduits dans un flacon jaugé de 50 cm^3 ; on ajoute 5 cm^3 d'extrait de Saturne, puis on complète à 50 cm^3 avec du sulfate de soude au 1/10. On obtient ainsi des liquides limpides. Cependant, dans certains cas exceptionnels où le filtrat était trop coloré pour l'examen polarimétrique, nous avons dilué la liqueur au 1/5 (soit une prise d'essai initiale de 10 cm^3) et décoloré au noir animal. Le pouvoir rotatoire est déterminé au tube de 2 dm. Le dosage des matières réductrices est effectué (selon la teneur en sucre) sur 2 ou 5 cm^3 de la liqueur déféquée, selon la méthode précise de G. BERTRAND [13] et exprimé en mg. de glucose. Les résultats sont ramenés à 100 g. de plante fraîche. La liqueur extractive est alors additionnée de 1 gramme d'invertine préparée selon la méthode de BOURQUELOT. (Rappelons qu'il est nécessaire de faire agir l'invertine avant l'émulsine, puisque ce dernier ferment contient toujours des traces de sucrase, qui pourraient fausser les résultats). On laisse huit jours (1) à l'étuve à 30° en agitant fréquemment. On détermine de nouveau la déviation et la teneur en sucres réducteurs. On détruit l'invertase en mettant le flacon bouché dix minutes au bain-marie bouillant. On ajoute 0,50 d'émulsine d'amandes douces, préparée selon la méthode de HÉRISSEY [131], au liquide refroidi. On remet à l'étuve 8-10 jours en agitant quotidiennement. On détermine pour la dernière fois le pouvoir réducteur et la rotation polarimétrique.

Nous n'exposerons ici que les variations obtenues sous l'influence de l'émulsine, l'étude de l'invertine étant faite dans la quatrième partie de ce travail. Nous envisagerons successivement l'action du chloroforme, de l'éther, puis du formol et enfin de l'acroléine.

(1) Au bout de ce temps, ainsi que nous l'avons vérifié, l'action de l'invertine est largement terminée.

I. — Action du chloroforme.

On sait depuis longtemps que les vapeurs de chloroforme font noircir rapidement les feuilles d'*Aucuba*, mais les phénomènes n'avaient pas été étudiés quantitativement jusqu'aux expériences de MASCRÉ qui, avec POUSSET [155], étudia les variations du contingent glucidique chez l'*Aucuba* sous l'influence du chloroforme, et sur lesquelles nous reviendrons. Nous avons employé le chloroforme à forte dose (en vapeur saturante) et à faible dose.

A. — ACTION DU CHLOROFORME EN VAPEUR SATURANTE.

Un cristallisateur contenant 100 grammes de feuilles d'*Aucuba* est placé dans une cloche à vide. On fait le vide partiel à l'aide d'une trompe à eau jusqu'à une pression de quelques millimètres de mercure. Puis, on fait tomber à l'intérieur de la cloche, à l'aide d'une ampoule à brome, un excès de chloroforme et on laisse agir pendant un temps déterminé (1). Un témoin est placé dans les mêmes conditions dans une cloche identique mais sans chloroforme. On stabilise au sortir de la cloche le témoin et le lot chloroformé. On fait un essai biochimique, dont nous avons précédemment décrit la technique. Nous avons fait agir le chloroforme en vapeur saturante pendant 1 heure et 2 heures. Nous n'avons pas procédé à des essais de plus longue durée car l'hydrolyse était presque totale.

Voici d'ailleurs les résultats obtenus : (feuilles cueillies en mars).

TABLEAU I. — Action du chloroforme en vapeur saturante sur les feuilles d'*Aucuba japonica*.

	Témoin 1 heure	Chloro- forme 1 heure	Témoin 2 heures	Chloro- forme 2 heures
<i>Déviatiou (tube 2 dm.) :</i>				
Avant émulsion.....	— 11°46'	± 0	— 10°40'	+ 2°
Après émulsion.....	+ 2°	+ 2°30'	+ 2°30'	+ 2°8'
<i>S. R. p. 100 (exp. en gluc.) :</i>				
Avant émulsion.....	2.221	3.288	2.063	4.312
Après émulsion.....	3.550	3.703	3.810	4.400
<i>Action de l'émulsion :</i>				
Retour de la déviation.....	13°46'	2°30'	13°10'	8'
Sucré réducteur formé.....	1.329	415	1.747	88
Chiffres ramenés à 100 cm ³ de liqueur représentant 100 g. de feuilles.				

(1) On sait par les expériences de MAQUENNE et DEMOUSSY [150] que les feuilles d'*Aucuba* peuvent être maintenues plusieurs heures dans le vide sans qu'il y ait plasmolyse ou noircissement.

Variations des hétérosides des feuilles d'Aucuba, sous l'influence du chloroforme.

Une heure de vapeur saturante :

Sucre réducteur formé sous l'action de l'émulsine..... 415 mg.
soit une diminution de..... 70 p. 100 par rapport au témoin

Deux heures de vapeur saturante :

Diminution de..... 95 p. 100

Si nous calculons d'après la déviation polarimétrique, ou la teneur en sucre réducteur, la valeur de l'hydrolyse par rapport au témoin, nous voyons que celle-ci est très élevée ; elle atteint 95 p. 100 au bout de deux heures. Les chiffres de sucre réducteur exprimés en glucose étant obtenus par une méthode plus précise que la méthode polarimétrique, c'est d'après les chiffres de sucre réducteur que nous avons fait nos calculs. Ces expériences, comme d'ailleurs tous les essais biochimiques qui vont suivre, ont été effectués à plusieurs reprises, à différentes époques de la végétation. Pour la commodité de l'exposition, nous ne donnons qu'une expérience.

Sous l'influence du chloroforme, il y a donc eu accélération de l'action diastasique envisagée dans le sens hydrolysant (celle-ci étant pratiquement nulle à l'état vivant et même beaucoup moins marquée après la mort du végétal).

Obtention des produits fermentaires. — Nous avons tenté d'extraire les ferments des feuilles d'*Aucuba* (on a déjà signalé dans ces feuilles la présence d'émulsine, de lactase et de galactosidase) avec l'espoir d'obtenir des poudres ou extraits fermentaires « activés » c'est-à-dire plus actifs que les témoins.

Nous avons préparé les poudres fermentaires suivant une technique analogue à celle de BOURQUELOT et HÉRISSEY [37] modifiée par CHEYMOL [66]. Les feuilles sont passées au hachoir universel, traitées par trois volumes d'alcool à 90°. On laisse le tout dans un flacon émeri pendant 12 heures, en agitant fréquemment. Onessore sur un entonnoir de « Büchner » puis on met dans un appareil à percolation et on lixivie rapidement avec dix volumes d'alcool. On fait sécher à l'étuve à 37°, on passe au moulin à café : 100 grammes de feuilles donnent 15-16 grammes de poudre fermentaire (1).

(1) Pour obtenir des poudres fermentaires comparables entre elles il faut procéder dans des conditions rigoureusement identiques. En effet l'activité varie avec l'époque de la récolte, le temps de contact avec l'alcool, la finesse de la poudre, etc.

Quant aux extraits fermentaires, nous avons opéré de la façon suivante : 300 grammes de feuilles d'*Aucuba* sont soumis en vase clos à l'action des vapeurs de chloroforme. On fait un témoin dans les mêmes conditions, mais sans chloroforme ; on broie au hachoir universel, on épuise par 3 litres d'alcool à 80° dans un appareil à lixiviation ; on fait sécher le marc à l'étuve à 30° pendant 24 heures pour enlever les dernières traces d'alcool, on ajoute 500 cm³ d'eau distillée et quelques gouttes de toluène. On agite 4 heures à l'aide d'un agitateur mécanique. On filtre, on concentre le liquide obtenu jusqu'à 100 cm³ dans le vide sulfurique, on ajoute 800 cm³ d'alcool à 95° ; on laisse reposer 24 heures, on recueille le précipité qu'on lave à l'éther et sèche à l'étuve.

Pour la poudre fermentaire, les rendements ont été identiques à ceux des témoins. Quant aux extraits, les lots chloroformés nous ont donné des valeurs un peu supérieures (1,50 au lieu de 1,30 pour 300 grammes de feuilles). L'activité de ces différents produits a été essayée sur le salicoside.

Salicoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 5 jours	Après 10 jours
Poudre fermentaire témoin.....	— 1°16'	± 0	+ 16'
Poudre fermentaire après 1 h. CHCl ₃ .	— 1°16'	+ 20'	+ 34'

La poudre fermentaire « chloroformée » est plus active que le témoin. Cependant cette activation est relativement faible ; nous verrons par la suite qu'elle est quelquefois insignifiante. Cela tient peut être au mode de préparation de la poudre fermentaire mais peut être aussi au mode d'action du chloroforme *in vivo*. Nous reviendrons d'ailleurs sur ce phénomène lors de nos conclusions sur l'émulsine.

Amygdalosite à 2 p. 100 + 0,20 p. 100 d'extrait fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 4 jours	Après 10 jours
Extrait fermentaire témoin.....	— 1°30'	— 1°24'	— 1°24'
Extrait fermentaire après 4 h. CHCl ₃ .	— 1°30'	— 1,20'	— 1°20'

Salicoside à 2 p. 100 + 0 g., 20 p. 100 d'extrait fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 4 jours	Après 10 jours
Extrait fermentaire témoin.....	— 2°20'	— 2°16'	— 2°10'
Extrait fermentaire après 4 h. CHCl ³ .	— 2°20'	— 2°16'	— 2°12'

Les extraits fermentaires provenant de feuilles soumises à l'action du chloroforme ne sont pas plus actifs que les témoins.

Remarquons également le très faible pouvoir diastasique des extraits fermentaires ; l'extraction des ferments par l'eau à été très faible, malgré la division du végétal et l'agitation énergique.

B. — ACTION DE FAIBLES DOSES DE CHLOROFORME.

Comme précédemment, nous avons préparé des lots de 100 grammes aussi homogènes que possible. Nous avons introduit les feuilles dans des flacons à large ouverture et nous avons ajouté 1 cm³ de chloroforme par litre (soit 1/1.000) ; nous avons employé des flacons de 2 litres bouchés à l'émeri dans lesquels nous mettions 2 cm³ de chloroforme. On bouchait soigneusement et on laissait plusieurs jours. Les lots témoins étaient également conservés en vase clos. Au bout d'un temps déterminé, les feuilles étaient retirées des flacons et stabilisées immédiatement à l'alcool bouillant et on procédait à un essai biochimique.

Voici les résultats obtenus après une action de 4 jours.

TABLEAU II. — *Action des vapeurs de chloroforme au millième sur les feuilles d'Aucuba japonica.*

Déviation :	Témoin 4 jours	Chloroforme 4 jours
Avant émulsine	— 12°16'	+ 1°52'
Après émulsine	+ 2°	+ 2°10'
<i>Sucre réducteur :</i>		
Avant émulsine	2.221	2.966
Après émulsine	3.550	3.966
<i>Action de l'émulsine :</i>		
Retour de la dérivation	14°16'	18'
Sucre réducteur formé.....	1.329	0
Date de l'expérience	Février	

Si l'on envisage les sucres réducteurs, on voit qu'avec les feuilles chloroformées il n'y a pas eu de formation de sucre réducteur sous l'influence de l'émulsine. En présence de vapeur de chloroforme, il s'est donc produit une hydrolyse totale de l'aucuboside. On aboutit donc aux mêmes résultats qu'avec de fortes doses en vapeur saturante ; il y a eu stimulation de l'activité hydrolysante de l'émulsine *in vivo* sous l'influence du chloroforme et dans ce cas nous avons tenté d'extraire un produit fermentaire « activé », soit une poudre, soit un extrait, suivant les techniques indiquées précédemment. Ici encore, nous n'avons pas pu obtenir d'extraits fermentaires plus actifs que ceux des témoins ; il n'y a pas eu non plus augmentation du rendement ; mais par contre, les poudres fermentaires étaient plus actives que les témoins.

Dosages pondéraux d'aucubigénol.

Nous avons voulu vérifier, par une autre méthode que la méthode biochimique, le dédoublement de l'aucuboside provenant d'une stimulation de l'activité hydrolysante de l'émulsine sous l'influence du chloroforme.

Nous nous sommes adressé pour cela à des dosages pondéraux de l'aglycone, l'aucubigénol, méthode étudiée par LEBAS [144].

I. *Principe de la méthode.* — Sous l'influence des acides, l'aucuboside donne du glucose et de l'aucubigénol qui fournit par polymérisation un corps noir insoluble, se formant lentement à froid, mais rapidement à chaud, et la réaction est quantitative. LEBAS a établi un coefficient entre le poids du précipité obtenu et la quantité d'aucuboside mise en œuvre.

II. *Technique.* — On part de la liqueur extractive des essais biochimiques, diluée au quart, ou bien on stabilise les feuilles (25 grammes) par 250 grammes d'alcool à 95° bouillant. On épuise en réfrigérant à reflux pendant 30 minutes. On fait un deuxième épuisement. Les liqueurs alcooliques sont réunies, puis distillées à sec. L'extrait sec est repris par 100 cm³ d'eau distillée chaude employée en plusieurs fois. On prélève à la pipette 20 cm³ de cette liqueur (représentant 5 grammes de feuilles). On met dans un Erlenmeyer ; on ajoute X gouttes d'acide sulfurique, puis 80 cm³ d'eau distillée. On ferme avec

un bouchon en caoutchouc traversé par un tube, de façon à éviter l'évaporation. On met 1 heure au bain-marie bouillant. La solution noircit de plus en plus ; il se forme un précipité d'aucubigénol polymérisé. On laisse déposer 24 heures pour mieux rassembler le précipité. On recueille sur un filtre de Gooch taré, on lave à plusieurs reprises avec 20 cm³ d'eau distillée. On s'assure que tout le glucose est bien éliminé en vérifiant que le filtrat n'est pas réducteur, puis on porte le creuset à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant. Le poids trouvé multiplié par $\frac{100}{36}$ donne le poids d'aucuboside correspondant.

III. *Application.* — Nous avons appliqué cette méthode aux feuilles d'*Aucuba* ayant subi l'action du chloroforme. Les résultats obtenus confirment ceux obtenus par la méthode biochimique.

Cependant, les chiffres obtenus ici sont inférieurs. Par exemple, au bout d'une heure de vapeur saturante de chloroforme, cette méthode pondérale n'indique qu'une hydrolyse de 53 p. 100, au lieu de 70 p. 100 par la méthode biochimique. Cela tient vraisemblablement à ce que, dans les liqueurs provenant des lots chloroformés, il reste un peu d'aucubigénol ; ces liqueurs sont en effet plus noires que les liqueurs témoins.

Dosage d'aucubigénol total.

Nous avons essayé également de doser non plus l'aucubigénol provenant des liqueurs pour essai biochimique, mais l'aucubigénol *total* provenant du glucoside intact et du glucoside hydrolysé.

Malheureusement, l'épuisement par l'alcool n'enlève pas tout l'aucubigénol. Nous avons essayé d'autres solvants (en particulier l'acétone) : jamais nous n'avons pu enlever aux feuilles la totalité de l'aucubigénol dont une partie imprègne toujours les feuilles et les colore en noir.

Nous regrettons de n'avoir pu doser l'aucubigénol total car il eut été intéressant de voir si (comme dans le cas du Laurier-cerise) il n'y avait pas augmentation de l'aglycone sous l'influence des substances organiques étudiées — fait qui serait en accord avec l'augmentation de sucre réducteur constatée lors des essais biochimiques après action de l'émulsine.

CONCLUSIONS.

1° Nos expériences sur les feuilles d'*Aucuba* soumises à l'action du chloroforme sont donc en complet accord avec celles de MASCRÉ et POUSSET :

L'activation se traduit par une hydrolyse rapide, puisqu'en deux heures de vapeur saturante de chloroforme la presque totalité de l'aucuboside est dédoublée. En employant de plus faibles doses, on arrive également aux mêmes résultats, mais il faut augmenter la durée d'action.

2° Quant aux produits fermentaires correspondants, on constate une légère augmentation de l'activité des poudres fermentaires préparées à partir des lots chloroformés.

Des faits analogues ont déjà été signalés par WILLAMAN [199] à propos des feuilles de Sorgho, les produits fermentaires obtenus après action du chloroforme étaient plus actifs que les témoins.

II. — Action de l'éther sur les feuilles d'*Aucuba*.

a) *En vapeur saturante*. — Depuis les expériences de GUIGNARD et de MIRANDE, on sait que les vapeurs d'éther, comme celles de chloroforme, font noircir les feuilles d'*Aucuba*. Récemment, ce phénomène a été étudié quantitativement par M. MASCRÉ [155] en collaboration avec POUSSET.

Etudiant les variations du contingent glucidique chez les feuilles d'*Aucuba* sous l'influence de l'éther en vapeur saturante, MASCRÉ et POUSSET trouvaient une diminution de 52 p. 100 des hétérosides tributaires de l'émulsine au bout d'une heure d'éther en vapeur saturante, et une diminution de 95 p. 100 au bout de trois heures. Les résultats sont tout à fait comparables à ceux qui ont été obtenus avec le chloroforme.

Chez l'*Aucuba*, nous constatons donc une hydrolyse rapide de l'hétéroside, la quantité dédoublée étant proportionnelle au temps d'action — au bout de 3 ou 4 heures, cette hydrolyse est pratiquement totale (1). Il semble donc que dans le cas de l'*Aucuba*, l'activation se fasse dans le sens de l'hydrolyse. Nous verrons que les phénomènes obtenus sont différents avec les feuilles de Laurier-cerise.

Comme précédemment, nous avons extrait les poudres fermentaires après action de l'éther en vapeur saturante pendant 1 heure, 2 heures, 4 heures et nous avons essayé les produits obtenus sur le salicoside à 1 p. 100.

Salicoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviatiôn	Initiale	Après 5 jours	Après 10 jours
Poudre témoin	— 1°16'	+ 0	+ 10'
Poudre éthérée 1 heure	— 1°16'	+ 2'	+ 10'
Poudre éthérée 2 heures	— 1°16'	+ 10'	+ 26'
Poudre éthérée 4 heures	— 1°16'	+ 12'	+ 30'

(1) L'action est donc analogue à celle du chloroforme, mais elle est moins rapide : avec le chloroforme employé dans les mêmes conditions l'hydrolyse était pratiquement totale en deux heures.

Les poudres fermentaires des lots étherés sont légèrement plus actives que les poudres témoins. Le même phénomène avait déjà été constaté avec le chloroforme.

b) *Action prolongée de l'éther à petite dose.* — Comme pour le chloroforme, nous avons mis des feuilles d'*Aucuba* dans une atmosphère contenant 1 pour 1000 d'éther. Les feuilles noircissent beaucoup moins vite qu'en vapeur saturante ; le noircissement ne se produit guère qu'au bout de 48 heures. Nous avons laissé les feuilles 4 jours dans une telle atmosphère et nous avons fait un essai biochimique, en prenant les précautions habituelles, spéciales à l'*Aucuba*, c'est-à-dire que nous avons mis les liqueurs au bain-marie bouillant pendant une demi-heure (pour éliminer l'aucubigénol) avant de faire l'examen polarimétrique et la détermination des sucres réducteurs. Quand ce traitement ne suffisait pas à rendre les solutions suffisamment claires pour l'examen polarimétrique, nous les avons diluées au cinquième.

TABLEAU III. — *Action de l'éther à petite dose sur les feuilles d'Aucuba (chiffres ramenés à 100 cm³ de liqueur, représentant 100 g. de feuilles fraîches).*

	Témoin 4 jours	Ether 4 jours
<i>Déviatiou :</i>		
Avant émulsine.....	— 12°16'	+ 1°20'
Après émulsine.....	+ 2°	+ 2°10'
<i>Sucres réducteurs :</i>		
Avant émulsine.....	2.221	3.761
Après émulsine.....	3.550	3.873
<i>Action de l'émulsine :</i>		
Retour de la déviation.....	14°16'	50'
Sucre réducteur formé.....	1.329	112
Date de l'expérience.....	Février	

L'hydrolyse de l'hétéroside est presque totale. Ici encore, l'action est comparable à celle du chloroforme ; mais elle est moins rapide.

Nous avons préparé, par la méthode habituelle, les poudres fermentaires correspondantes :

Salicoside 1 p. 100 + 1 p. 100 poudre fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 5 jours	Après 10 jours
Poudre témoin.....	— 4°16'	— 12'	+ 10'
Poudre éthérée.....	— 1°16'	+ 4'	+ 26'

Ici encore, la poudre éthérée est plus active que la poudre témoin.

En résumé : les résultats obtenus avec l'éther sont tout à fait comparables à ceux obtenus avec le chloroforme.

1. L'activation se traduit par une prédominance de l'action hydrolysante aboutissant à la disparition de l'hétéroside en quelques heures.

2. Les poudres fermentaires (à l'exclusion des extraits fermentaires) sont légèrement plus actives que les poudres témoins.

3. Même après action de l'émulsine, les lots chloroformés ou éthérés sont encore plus riches en sucre réducteur que les témoins.

Ce fait avait déjà été signalé par MASCRÉ et POUSSET.

Mais quelle est l'origine de cet excès de sucre réducteur ? Il provient vraisemblablement de l'hydrolyse d'un oside. Est-ce l'amidon, comme le suggèrent MASCRÉ et POUSSET, ou de l'aucuboside qui se serait formé en plus grande quantité dans les lots chloroformés ou éthérés ? Cette deuxième hypothèse est à envisager à la suite des faits nouveaux constatés avec le Laurier-cerise ; nous verrons en effet que l'activation des ferments par le chloroforme et l'éther peut dans certains cas porter à la fois sur l'action synthétisante et sur l'action hydrolysante.

III. - Action des vapeurs de formol sur les feuilles d'*Aucuba*.

a) *En vapeur saturante*. — Le formol (1) est connu comme inhibiteur des réactions diastasiques *in vitro*. Pour l'émulsine le fait a été signalé par BOURQUELOT et DANJOU [33]. En est-il de même *in vivo* ?

Son action sur les feuilles d'*Aucuba* a donné lieu à quelques controverses. MIRANDE [159] avait prétendu que les vapeurs de formol ne provoquaient pas le noircissement des feuilles d'*Aucuba* ; mais, par la suite, GUÉRIN et LORMAND [114] employant de jeunes feuilles, et avec de petites doses (10 gouttes par litre) obtinrent ce noircissement. Ils eurent le même résultat avec de fortes doses et, dans ce cas, le noircissement était plus rapide. Nous avons étudié ce phénomène au point de vue quantitatif, mais nous avons procédé auparavant à quelques expériences préliminaires.

Disons tout de suite que, comme GUÉRIN et LORMAND, nous avons obtenu, sous l'influence du formol, le noircissement des feuilles d'*Aucuba*. Notons cependant que ce noircissement est long à se produire et qu'il n'est pas très accentué — de plus, il ne se produit pas avec des feuilles âgées. D'ailleurs, les feuilles noircissent davantage si on les expose à l'air après l'action des vapeurs de formol et elles deviennent rapidement tout à fait noires si on fait agir, après le formol, des vapeurs de chloroforme. Ce fait se produit encore même après 24 heures d'action de formol en vapeur saturante. Nous verrons qu'il n'en est pas de même avec l'acroléine, qui se montre plus nocive pour les ferments.

Ces expériences montrent donc que l'émulsine n'est pas détruite, mais simplement partiellement inhibée par les vapeurs de formol. Voici d'ailleurs les résultats obtenus :

(1) Nous désignons sous le nom de formol la solution officinale de formaldéhyde à 35 p. 100.

TABLEAU IV. — *Action du formol en vapeur saturante sur les feuilles d'Aucuba japonica.*

	Témoin 1 heure	Formol 1 heure	Témoin 3 heures	Formol 3 heures
<i>Déviation :</i>				
Avant émulsine.....	— 10°40'	— 10°8'	— 11°	10°20'
Après émulsine.....	+ 2°	+ 2°8'	+ 30'	+ 30'
<i>Sucre réducteur :</i>				
Avant émulsine.....	2.521	2.063	1.743	2.197
Après émulsine.....	4.400	3.810	3.072	3.440
<i>Action de l'émulsine :</i>				
Retour de la dérivation..	12°40'	12°16'	11°30'	10°50'
Sucre réducteur formé ..	1.879	1.747	1.329	1.243
■				
Date de l'expérience ..	Avril			

Variations des hétérosides dédoublables par l'émulsine.

Au bout d'une heure de formol en vapeur saturante : *diminution* de 6 p. 100.

Au bout de 3 heures de formol en vapeur saturante : *diminution* de 6 p. 100.

Sous l'influence du formol, il y a donc une légère hydrolyse de l'aucuboside (1), mais le taux de l'hydrolyse n'a pas augmenté avec l'augmentation de la durée d'action. De plus, les variations observées sont presque de l'ordre des erreurs d'expériences.

b) *Action du formol à faible dose.* — Voyons maintenant l'action du formol à plus faible dose et pendant un temps plus prolongé.

Nous avons mis des feuilles d'*Aucuba* dans une atmosphère contenant 1 p. 1.000 de formol et nous avons procédé comparativement avec un témoin.

100 grammes de feuilles formolées ou de feuilles témoins ont été stabilisées à l'alcool bouillant, puis épuisées une se-

(1) Cependant les feuilles avaient fortement noirci.

conde fois à l'alcool. Les liqueurs alcooliques ont été évaporées à sec. L'extract a été repris par l'eau bouillante et filtré. Le filtrat a été amené à 100 cm³, représentant 100 grammes de feuilles. Sur la liqueur obtenue, on a fait des essais biochimiques suivant la méthode de BOURQUELOT, en prenant les précautions spéciales à l'*Aucuba* (voir page 36).

TABLEAU V. — *Action du formol à faible dose (1/1.000)
sur les feuilles d'Aucuba.*

	Témoin 4 jours	Formol 4 jours
<i>Déviation :</i>		
Avant émulsine	— 12°16'	— 7°40'
Après émulsine	+ 2°	+ 2°10'
<i>Sucres réducteurs :</i>		
Avant émulsine	2.221	2.821
Après émulsine	3.550	3.288
<i>Action de l'émulsine :</i>		
Retour de la déviation	14°16'	9°50'
Sucre réducteur formé	1.329	467
Date de l'expérience	Février	

Il y a eu hydrolyse de l'aucuboside, celle-ci atteint 34 p. 100 (d'après la diminution des sucres réducteurs).

Elle est nettement plus accentuée qu'en vapeur saturante. A petite dose et par contact prolongé, le formol a accéléré l'hydrolyse ; il s'est conduit comme un accélérateur des actions diastasiques. Cette activation est certes moins forte qu'avec le chloroforme ou l'éther, mais elle est cependant très nette puisqu'il y a eu décomposition du tiers du glucoside présent.

Comme d'ordinaire, nous avons préparé des *poudres fermentaires* avec les feuilles traitées et nous avons essayé leur activité au point de vue de l'émulsine en prenant comme test l'activité vis-à-vis du salicoside.

Salicoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 2 jours	Après 10 jours	Après 10 jours
Poudre fermentaire témoin .	— 1°16'	— 30'	+ 18'	+ 30'
Poudre formolée (1 heure en vapeur saturante)	— 1°16'	— 34'	+ 10'	+ 32'
Poudre formolée (3 heures en vapeur saturante)	— 1°16'	— 36'	± 0'	+ 12'
Poudre formolée (4 jours à faible dose)	— 1°16'	— 28'	+ 12'	+ 30'

Remarquons qu'il y a une légère atténuation des poudres fermentaires ayant subi l'action du formol en vapeur saturante pendant 1 heure et 3 heures. Pour ce qui est du formol à faible dose, son action est insignifiante.

En résumé : l'action du formol est donc nettement différente de celle du chloroforme et de l'éther (tout au moins pour ce qui est de l'action en vapeur saturante) :

1° L'hydrolyse est très faible et n'a pas augmenté avec la durée d'action du formol ;

2° Les poudres fermentaires sont légèrement atténuées par rapport aux témoins ;

3° Il n'y a pas d'une façon constante augmentation du sucre réducteur après action de l'émulsine dans les lots formolés.

IV. — Action de l'acroléine sur l'*Aucuba*.

a) *En vapeur saturante*. — Nous avons déjà indiqué que GUÉRIN et LORMAND [114] avaient étudié au point de vue qualitatif l'action de l'acroléine, ou aldéhyde acrylique (1), sur les végétaux.

En particulier avec les feuilles d'*Aucuba*, ils constatèrent un noircissement avec de faibles doses (10 gouttes par litre) et aucune action avec de fortes doses (50 gouttes par litre), même au début de l'expérience.

A l'aide de la méthode biochimique, nous avons étudié le phénomène au point de vue quantitatif. Disons dès maintenant que nos résultats concordent avec ceux de P. GUÉRIN et LORMAND.

En vapeur saturante, par conséquent à forte dose, il n'y a pas noircissement des feuilles d'*Aucuba*, mais si on retire les feuilles de l'atmosphère acroléinée et qu'on les laisse à l'air, elles noircissent légèrement ; si l'on fait agir le chloroforme, elles noircissent fortement. Mais, si l'on prolonge l'action de l'acroléine, les feuilles soumises ensuite à l'action du chloroforme noircissent de moins en moins. Après 8 heures de vapeurs saturantes d'acroléine, elles noircissent à peine ; pour obtenir cette action, il faut ajouter de l'émulsine aux feuilles broyées. Il semble donc que pour un contact peu prolongé avec l'acroléine, il n'y ait pas destruction, mais simplement inhibition du ferment. Mais, si l'on prolonge (au delà de 8 à 10 heures par exemple) l'action des vapeurs d'acroléine, on ne peut plus régénérer le ferment ; le phénomène devient irréversible. L'action de l'acroléine se différencie par là de celle du formol. L'acroléine, tout au moins *in vivo*, semble plus nocive pour l'émulsine que le formol.

(1) Ce corps étant très instable, nous avons employé pour toutes nos expériences de l'acroléine stabilisée par 0,50 p. 100 d'hydroquinone.

TABEAU VI. — Action de l'acroléine en vapeur saturante sur l'Aucuba.

	Témoin 1 heure	Acroléine 1 heure	Témoin 3 heures	Acroléine 3 heures
<i>Déviatiou :</i>				
Avant émulsine	— 10°28'	— 10°48'	— 10°50'	— 11°12'
Après émulsine	+ 2°26'	+ 2°	+ 2°26'	+ 2°
<i>Sucres réducteurs :</i>				
Avant émulsine	1.592	1.848	1.965	2.080
Après émulsine	3.280	3.480	3.713	3.742
<i>Action de l'émulsine :</i>				
Retour de la déviation...	12°54'	12°48'	13°16'	13°12'
Sucre réducteur formé ..	1.688	1.632	1.748	1.662
Date de l'expérience.....	Mars			

Les modifications observées (diminution de 3 p. 100 pour 1 heure, de 4 p. 100 pour 3 heures) sont de l'ordre des erreurs d'expériences ; à forte dose, l'acroléine inhibe l'action de l'émulsine *in vivo*.

b) *En est-il de même à faible dose ?* — C'est ce que nous avons voulu voir en soumettant des feuilles d'Aucuba, pendant 4 jours, à une atmosphère contenant 1/1.000 d'aldéhyde acrylique.

TABEAU VII. — Action de l'acroléine à faible dose sur les feuilles d'Aucuba.

	Témoin 4 jours	Acroléine 4 jours
<i>Déviatiou :</i>		
Avant émulsine	— 12°16'	+ 2°
Après émulsine	+ 2°	+ 2°30'
<i>Sucres réducteurs :</i>		
Avant émulsine	2.221	3.873
Après émulsine	3.550	3.966
<i>Action de l'émulsine :</i>		
Retour de la déviation.....	14°16'	30'
Sucre réducteur formé.....	1.329	93
Date de l'expérience	Février	

Les résultats sont tout à fait différents de ceux effectués en vapeur saturante. A faible dose, il y a donc eu hydrolyse presque totale (93 p. 100) du glucoside dédoublable par l'émulsine (1). Dans ces conditions, l'acroléine s'est conduite comme un stimulant, en accélérant les actions diastasiques.

Préparation des poudres fermentaires. Elles ont été obtenues suivant la technique habituelle. Nous avons ajouté 1 gramme des différentes poudres fermentaires à 100 cm³ de solution de salicoside à 1 p. 100.

Salicoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 3 j.	Après 5 j.	Après 10 j.	Après 20 j.
Poudre fermentaire témoin .	— 1°16'	— 4'	+ 6'	+ 26'	+ 32'
Poudre après 1 heure acroléine (forte dose)	— 1°16'	— 34'	— 4'	+ 26'	+ 30'
Do après 3 heures.....	— 1°16'	— 34'	— 14'	+ 10'	+ 32'
Poudre après 4 heures acroléine (faible dose)	— 1°16'	— 4'	+ 11'	+ 24'	+ 32'

Les poudres fermentaires, obtenues après action de l'acroléine en vapeur saturante, sont nettement atténuées, et cela d'autant plus que l'action a été prolongée ; elles sont cependant encore relativement actives.

De plus, comme il fallait s'y attendre, la poudre fermentaire obtenue après action de l'acroléine à faible concentration est aussi active que le témoin. L'acroléine a donc une action comparable à celle du formol. En vapeur saturante, elle ne provoque pas l'hydrolyse diastasique de l'aucuboside ; à faible dose elle peut provoquer le dédoublement de cet hétéroside. Il semble donc qu'en présence d'un excès d'acroléine, et bien qu'il y ait plasmolyse, il y ait inhibition de l'action de l'émulsine. Les résultats obtenus sont nettement différents, et même en quelque sorte opposés, suivant qu'on fait agir *in vivo* le chloroforme et l'éther ou qu'on s'adresse au formol et à l'acroléine.

(1) Cependant les feuilles n'étaient pas complètement noires. On voit donc que le degré de noircissement ne permet pas toujours d'apprécier, même approximativement, le taux d'hydrolyse de l'aucuboside.

Nous allons maintenant étudier les feuilles de Laurier-cerise, afin de voir si les résultats obtenus seront comparables. Nous tâcherons de voir, en particulier, si l'on obtient encore une augmentation des sucres réducteurs dans les lots traités, après action de l'émulsine, et nous essaierons d'interpréter cette augmentation de sucres réducteurs.

I. *En résumé*, nous avons constaté pour les feuilles d'*Aucuba*, sous l'influence du chloroforme en vapeur saturante, une diminution rapide de l'aucuboside (cette hydrolyse peut être totale en deux heures) et une augmentation des sucres réducteurs même après action de l'émulsine.

Les poudres fermentaires correspondantes se sont montrées généralement plus actives que les témoins.

Sous l'influence du chloroforme à faible dose on aboutit aux mêmes résultats, mais il faut augmenter la durée d'action.

Les dosages d'aucubigénol effectués sur les liqueurs extractives ont confirmé les résultats de la méthode biochimique. Quant à l'aucubigénol total, il peut difficilement être évalué chez les lots chloroformés, son extraction étant très difficile.

II. *Avec l'éther*, on obtient des résultats analogues. L'action est cependant un peu moins marquée que dans le cas du chloroforme.

III. *Le formol et l'acroléine* se comportent d'une autre façon, les résultats obtenus étant différents suivant la dose employée :

Sous leur influence, en vapeur saturante, il n'y a pas (ou presque pas) d'hydrolyse de l'aucuboside. A petite dose au contraire, il y a dédoublement de l'hétéroside.

Les produits fermentaires obtenus après action de fortes doses d'acroléine sont atténués par rapport aux témoins.

Remarquons que le chloroforme et l'éther, qui ont une action identique sur la structure de la cellule végétale (plasmolyse, destruction du chondriome, fusion des vacuoles, granulisation du cytoplasme) ont également une action identique au point de vue chimique, tout au moins pour ce qui est des hétérosides tributaires de l'émulsine.

CHAPITRE III.

Expériences sur les feuilles de Laurier-cerise

Le Laurier-cerise (*Prunus-Lauro-Cerasus* L.) (Rosacées) est cultivé très fréquemment comme arbuste d'ornement. Cette plante, réputée toxique, doit sa toxicité à l'acide cyanhydrique qui se dégage dès qu'on traumatise les feuilles.

Peu de temps après la découverte de l'amygdaline par ROBIQUET et BOUTRON en 1830, divers auteurs (WIDTMANN, DEULE, LIEBIG et WÖHLER) tentèrent l'isolement à l'état pur du composé cyanhydrique des feuilles de Laurier-cerise (1). En 1874, LEHMAN isole un glucoside à l'état amorphe et le nomme laurocérasine. Mais c'est HÉRISSEY [132] qui, le premier, obtint en 1905 à l'état cristallisé ce composé qu'il appela prulaurasine (prulaurasoside dans la nouvelle nomenclature). De formule $C^{14}H^{17}NO^6$ (pm. = 295) c'est l'hétéroside correspondant à l'acide phénylglycolique racémique (ses isomères sont : le *prunasoside* (2) qui correspond à l'acide phénylglycolique gauche et le *sambunigroside* correspondant à l'acide phénylglycolique droit). Par *hydrolyse* acide ou diastasique (émulsine), le prulaurasoside, donne du glucose, de l'aldéhyde benzoïque et de l'acide cyanhydrique :



C'est une substance cristalline, incolore, inodore, de saveur amère, soluble dans l'eau, l'alcool, l'éther acétique, insoluble dans l'éther ; elle est lévogyre ($[\alpha]_D = + 52^{\circ},75$) son point de fusion est de 120-122°. Elle donne par hydrolyse 9,15 p. 100 d'acide cyanhydrique et 61 p. 100 de glucose.

La teneur en composé cyanhydrique peut varier avec la pro-

(1) Voir à ce sujet l'article très documenté de M. H. HÉRISSEY [132].

(2) Ou amygdonitrileglucoside de FISCHER.

venance, le moment de la récolte. Elle semble diminuer avec l'apparition des feuilles. D'après BRIDEL [46], il faut utiliser les feuilles de l'année bien développées. Nous avons suivi ce conseil au cours de nos expériences ; de plus, nous avons indiqué la date de la récolte.

C'est Raphaël DUBOIS [89] qui, le premier, nota le dégagement d'acide cyanhydrique quand on soumettait des feuilles de Laurier-cerise à l'influence du chloroforme. Mais ce phénomène fut surtout étudié par GUIGNARD [119] qui, en 1909, caractérisa l'acide cyanhydrique formé à l'aide de son papier picro-sodé [117] réaction très sensible pour déceler la présence d'acide cyanhydrique chez les végétaux.

Sous l'influence de HCN, le papier picro-sodé rougit par suite de formation d'isopurpurate de potassium, suivant la réaction établie en 1859 par HLASIWETZ. Ce procédé fut employé par ARMSTRONG [4] pour déceler la présence d'émulsine dans les végétaux, et par MIRANDE [158] pour la recherche des glucosides cyanogénétiques.

Mais une question se pose : tout l'acide cyanhydrique du Laurier-cerise est-il sous forme glucosidique ?

WILLAMAN [198] étudiant le Sorgho, plante contenant également un glucoside cyanogénétique, le durrhoside, constata, à un certain moment de la végétation la présence d'acide cyanhydrique non glucosidique — évalué en recueillant les fruits de Sorgho dans une solution d'acide tartrique à 5 p. 100.

Il montra en effet que les glucosides cyanogénétiques (amygdaloside, durrhoside, prulaurasoside) ne sont pas hydrolysés par l'émulsine en présence de 5 p. 100 d'acide tartrique et que certaines feuilles de Sorgho produisant HCN par autolyse n'en produisaient plus en présence d'acide tartrique.

D'autre part, PECHE [171], en 1912, signale que le Laurier-cerise contient de l'acide cyanhydrique non glucosidique.

Nous avons repris cette question de l'*acide cyanhydrique non glucosidique*. Nous avons suivi la méthode de WILLAMAN à l'acide tartrique (nous avons vérifié au préalable que l'amygdaloside n'était pas hydrolysé en présence de 5 p. 100 d'acide tartrique).

Nous avons humecté nos feuilles de Laurier-cerise d'acide tartrique à 5 p. 100. Nous avons broyé au hachoir universel. Nous avons laissé 4 heures et nous avons distillé et dosé l'acide cyanhydrique dans le distillat suivant la méthode de LIEBIG-DENIGÈS (nous décrirons plus loin cette technique). Une

précaution s'impose : il faut humecter les feuilles avec la solution d'acide tartrique avant de broyer, car si on broye avant d'ajouter la solution acide, il y a une légère hydrolyse du prulaurasoside.

Comme WILLAMAN pour le Sorgho, nous avons trouvé une petite quantité d'acide cyanhydrique non glucosidique (de deux à cinq centigrammes en HCN pour 100 g. de feuilles fraîches) chez les feuilles de Laurier-cerise. Cette quantité est d'ailleurs variable suivant l'époque de la végétation : elle nous a paru très faible en hiver et plus élevée au printemps — D'autres expériences mériteraient d'être entreprises à ce sujet.

Sous quelle forme se trouve cet acide cyanhydrique non glucosidique ? Il ne nous paraît pas libre — car des feuilles placées dans une cloche avec un cristalliseur contenant de la soude puis soumises à un vide de quelques millimètres de mercure pendant 48 heures n'ont pas abandonné d'acide cyanhydrique. Peut-être est-il combiné à l'aldéhyde benzoïque sous forme de benzaldéhyde-cyanhydrine, qui est un des constituants du prulaurasoside, mais ce n'est là qu'une hypothèse.

Il existe donc de petites quantités d'acide cyanhydrique non glucosidique chez le Laurier-cerise, il est beaucoup moins abondant que l'acide cyanhydrique glucosidique ; son existence méritait cependant d'être signalée.

Enfin nous dirons que le prulaurasoside n'est pas le seul glucoside cyanogénétique du Laurier-cerise ; dans les graines on a trouvé de l'amygdaloside et, dans les jeunes pousses, du prunasoside (CHARAUX [64]).

I. — Action du chloroforme sur les feuilles de Laurier-cerise.

A. — EN VAPEUR SATURANTE.

Un cristalliseur contenant 100 grammes de feuilles est placé dans une cloche à vide (dont le volume est de 3 litres environ). On y fait un vide partiel à l'aide d'une trompe à eau, jusqu'à une pression de 5 à 6 mm. de mercure, puis, à l'aide d'une ampoule à brome précédemment introduite dans le bouchon supérieur, on fait tomber à l'intérieur de la cloche, dans un petit récipient disposé à cet effet, un excès de chloroforme. On laisse agir pendant un temps déterminé. Un témoin de même poids est placé dans une cloche identique, mais sans chloroforme. On stabilise au sortir de la cloche, le témoin et le lot chloroformé. On fait un essai biochimique dont nous avons déjà indiqué le principe et la technique.

Cependant, pour le Laurier-cerise (comme d'ailleurs pour toutes les plantes cyanogénétiques) il y a une précaution spéciale à prendre ; il faut éliminer l'acide cyanhydrique qui troublerait le dosage des sucres réducteurs, ainsi que l'ont montré H. HÉRISSEY et CHALMETTA [134].

Pour cela, avant défécation, on évapore une quantité connue de liqueur extractive au bain-marie bouillant jusqu'à réduction d'environ 50 p. 100. Puis on procède comme d'ordinaire.

Pour la clarté de l'exposé, nous ne donnerons qu'une seule expérience pour une même durée d'action du chloroforme ; mais comme pour l'*Aucuba*, ces expériences ont été répétées à plusieurs reprises et à différents moments de la végétation.

D'autre part, nous avons fait autant de témoins que d'expériences. On ne saurait en effet, même pour des expériences de courte durée, se contenter d'un témoin initial, car la composition des feuilles abandonnées à elles-mêmes se modifie très rapidement.

Voici les résultats obtenus par la méthode biochimique avec le chloroforme en vapeur saturante :

TABLEAU VIII. — *Action du chloroforme en vapeur saturante sur la feuille de Laurier-cerise.*

	Témoin 1 heure	CH Cl ³ 1 heure	Témoin 2 heures	CH Cl ³ 2 heures	Témoin 4 heures	CH Cl ³ 4 heures
<i>Déviation :</i>						
Avant émulsine	— 2°10'	— 2°	— 2°16'	— 3°12'	— 1°52'	— 1°40'
Après émulsine	+ 10'	+ 32'	+ 1°	+ 8'	+ 40'	+ 10'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant émulsine	1.853	1.700	1.693	1.693	1.292	1.955
Après émulsine	2.653	2.672	2.663	2.663	2.572	2.705
<i>Action de l'émulsine :</i>						
Retour de la déviation	2°20'	2°32'	3°16'	3°20'	2°32'	1°50'
Sucre réducteur formé	800	972	970	970	1.280	750
Date de l'expérience..	Novembre		Janvier		Novembre	

Nous pouvons déduire de ce tableau les variations des hétérosides, dédoublables par l'émulsine, sous l'influence des vapeurs de chloroforme ; nous pouvons pour cela nous adresser soit aux variations de la déviation polarimétrique, soit aux variations du sucre réducteur (exprimé en glucose). Les deux moyens nous donnent des résultats identiques, aux erreurs d'expériences près. Cependant, les chiffres des sucres réducteurs étant obtenus par une méthode plus précise, (celle de G. BERTRAND) que celle des déviations polarimétriques, c'est à ces chiffres que nous avons donné la préférence. Voici donc le tableau des variations des hétérosides :

I. — 1 heure de vapeur saturante :

S. R. formé sous l'action de l'émulsine : 972 mg., soit une *augmentation* de 13 p. 100 par rapport au témoin.

II. — 2 heures de vapeur saturante :

S. R. formé (chiffre absolu), néant. *Pas de changement* par rapport au témoin.

III. — 4 heures de vapeur saturante :

S. R. formé = 750 mg., soit une *diminution* de 44 p. 100 par rapport au témoin.

Il y a là plusieurs faits intéressants à retenir. Il n'y a pas, comme on pourrait le croire, hydrolyse d'autant plus forte que l'action du chloroforme s'est plus prolongée. Il semblerait à première vue *qu'il y aurait d'abord synthèse puis hydrolyse*. Mais, nous avons voulu contrôler les résultats de la méthode biochimique par des dosages d'acide cyanhydrique faits dans les mêmes conditions sur des lots identiques et nous verrons, à la lumière de ces dosages, comment on peut interpréter ces résultats.

Notons aussi dès maintenant lors des essais biochimiques, l'augmentation des sucres réducteurs dans les cas des feuilles chloroformées (par rapport aux feuilles témoins), après action de l'émulsine.

Dosage de l'acide cyanhydrique.

Pour les dosages de HCN chez les végétaux (dosages qui sont assez délicats si l'on veut atteindre une certaine précision) diverses méthodes ont été proposées. WALLER [195] conseille un dosage colorimétrique sur le distillat à l'aide du mélange acide picrique et carbonate de soude employé dans des conditions déterminées. On fait en même temps une échelle colorimétrique obtenue avec des quantités connues de HCN.

WILLAMAN [198], voulant doser l'acide cyanhydrique des feuilles de Sorgho, insiste sur les difficultés du dosage de ce principe chez les végétaux ; cet auteur sépare HCN par distillation en présence d'acide tartrique reçoit le distillat dans de la soude diluée, et termine par un dosage colorimétrique au ferrocyanure de potassium.

Nous citerons encore la méthode de FORDOS et GELIS [99] reposant sur l'action de l'iode sur les cyanures, suivant la réaction



On verse une solution titrée d'iode dans la solution alcaline d'acide cyanhydrique additionnée de bicarbonate de sodium. Lorsque tout le cyanure est décomposé, l'excès d'iode donne une coloration jaune à la solution. Ce procédé très séduisant au point de vue théorique ne nous a pas donné de bons résultats, sans doute à cause du manque de spécificité de la réaction à l'iode, troublée par des substances accompagnant l'acide cyanhydrique dans les produits de distillation des macérés de feuilles de Laurier-cerise. Nous avons donc adopté la méthode

classique de LIEBIG, [146], modifiée par DENIGÈS [72]. On sait que ce procédé est basé sur l'action du nitrate d'argent sur le cyanure en milieu ammoniacal, et en présence d'iodure de potassium comme indicateur ; l'iodure d'argent, insoluble en milieu ammoniacal, marque nettement, par le trouble qu'il produit, le terme du dosage.

Technique. — Nous distinguerons deux parties :

1° obtention du distillat.

2° dosage de HCN dans ce distillat.

1. *Obtention du distillat.* — Nous nous sommes inspirés de la technique employée par GUIGNARD [118] lors de ses belles recherches sur le dosage de l'acide cyanhydrique du *Phaseolus lunatus* L. ainsi que de celle de KOHN-ABREST [141].

20 ou 25 grammes de feuilles de Laurier-cerise sont contusées, puis introduites dans un ballon en Pyrex de 3 litres. On fait un vide partiel dans le ballon ; on ajoute du chloroforme en excès de façon à être en vapeur saturante ; on laisse une heure, deux heures ou quatre heures. Grâce au vide, on fait rentrer 250 cm³ d'eau distillée, puis on laisse revenir à la pression atmosphérique. On met deux tubes en verre, l'un plongé dans le liquide sert au passage de la vapeur, l'autre est relié au réfrigérant.

Afin d'éviter toute perte de HCN dans l'atmosphère, ces deux tubes sont primitivement fermés par un caoutchouc muni d'une pince de Mohr.

On laisse macérer un temps déterminé, avec ou sans addition d'émulsine (nous verrons tout à l'heure l'importance de ces différents facteurs) puis, après avoir ajouté 50 cm³ de solution d'acide tartrique à 10 p. 100, on réunit le ballon d'un côté à un réfrigérant, de l'autre à un générateur de vapeur (nous avons en effet constaté qu'une distillation simple donnait de moins bons résultats). L'extrémité du réfrigérant plonge dans 50 cm³ d'eau distillée additionnée de 10 cm³ d'ammoniaque et de X gouttes de lessive de soude, (cette dernière ayant pour but d'empêcher la précipitation d'hydrobenzamide, qui se formerait en milieu ammoniacal avec l'aldéhyde benzoïque, passant à la distillation, et provenant du dédoublement du prurlaurasoside).

On commence par chauffer le ballon contenant le macéré,

puis on fait passer le courant de vapeur (1). On distille jusqu'à ce que le trouble d'iodure d'argent ne disparaisse plus. Pour cela, dès le début de l'expérience, on ajoute à la solution ammoniacale 5 cm³ d'une solution d'iodure de potassium à 10 p. 100 et on ajoute à la solution de nitrate d'argent jusqu'à opalescence. Comme le conseille BESQUEUT [14] (qui dosa l'acide cyanhydrique des graines de lin) en procédant sur fond noir, on peut employer la solution de nitrate d'argent au cinquième normale (1 cm³ correspond à 0 g.,00128 de HCN). Nous avons essayé cette méthode sur des solutions d'amygdaleside (après hydrolyse par l'émulsine), l'erreur n'a pas dépassé 2 à 3 p. 100.

Au cours de nos expériences sur le Laurier-cerise, nous avons été amené à constater que le temps de macération (ou d'autolyse) (2) après action du chloroforme avait une grande importance sur la quantité d'acide cyanhydrique dégagé ; si ce temps de macération est trop prolongé, la quantité d'acide cyanhydrique diminue : un témoin qui donnait 119 mg. de HCN p. 100 après 4 heures d'autolyse, n'en donnait plus que 86 après 24 heures d'autolyse, et 44 après 48 heures. Des faits analogues ont été constatés par WILLAMAN [199] lors du dosage de l'acide cyanhydrique chez les feuilles de Sorgho. Il explique ce fait par une rétention de HCN par les tissus lors d'une autolyse prolongée.

Voici maintenant les résultats de nos dosages d'acide cyanhydrique (3) après action du chloroforme en vapeur saturante sur les feuilles de Laurier-cerise. Les résultats exprimés en mg. pour 100 grammes de feuilles.

	1 heure	2 heures	4 heures
Lot témoin.....	104	102	102
Lot chloroformé.....	112	122	140

Dans tous les cas, il y a eu *augmentation de l'acide cyanhydrique total* (4).

(1) S'il y a de la mousse, on facilite la distillation en ajoutant quelques gouttes d'huile.

(2) La méthode par autolyse nous a donné de meilleurs résultats que l'hydrolyse acide. On sait d'ailleurs depuis les travaux de GUIGNARD qu'il ne faut pas employer d'acides minéraux dans les dosages de HCN chez les végétaux.

(3) Tous nos dosages ont été effectués après 4 heures d'autolyse.

(4) La méthode employée dose à la fois l'acide cyanhydrique glucosidique et l'acide cyanhydrique non glucosidique.

Interprétation des résultats.

Plusieurs explications sont possibles.

On peut songer à une augmentation de l'hydrolyse du prunellaurasoside, celle-ci étant incomplète chez les lots témoins et complète chez les lots chloroformés. On peut admettre aussi sous l'influence du chloroforme, une stimulation, non seulement de l'activité hydrolysante, mais encore de l'activité synthétisante de l'émulsine. Enfin on pourrait croire que l'augmentation provient uniquement de l'acide cyanhydrique non glucosidique.

Le mécanisme invoqué par la première hypothèse intervient peut être ; en tout cas, il nous semble insuffisant, étant données les variations observées : dans certaines conditions l'acide cyanhydrique des lots chloroformés est doublé par rapport au témoin il faudrait donc admettre que, dans ces cas, il n'y a eu que 50 p. 100 d'hétéroside hydrolysé chez le témoin, ce qui nous paraît peu vraisemblable.

La troisième hypothèse n'est pas en accord avec les résultats des essais biochimiques puisqu'on constate une augmentation d'hétéroside, donc une augmentation de HCN glucosidique, parallèle à l'augmentation de l'acide cyanhydrique total. De plus nous avons dosé, à l'aide de la méthode de WILLAMAN (voir généralités sur le Laurier-cerise), l'acide cyanhydrique non glucosidique chez les lots chloroformés (1) : celui-ci est quelquefois légèrement augmenté, mais beaucoup moins que l'acide cyanhydrique total.

Par contre de nombreux faits sont en faveur de la seconde hypothèse et en particulier les résultats des essais biochimiques. Suivant la durée d'action des vapeurs de chloroforme, nous constatons une augmentation, puis une diminution de la quantité d'hétéroside dédoublable par l'émulsine ; de plus dans les lots chloroformés, on constate toujours une augmentation des sucres réducteurs après action de l'émulsine. On peut penser que ce sucre réducteur, en partie tout au moins, provient de l'hydrolyse de l'hétéroside qui existerait en plus grande quantité chez les lots chloroformés (et cela est d'accord avec la synthèse constatée au début de l'expérience).

Sous l'influence des vapeurs de chloroforme, il y aurait stimulation à la fois de l'activité synthétisante et de l'activité hydrolysante de l'émulsine. On peut se demander si cette action

(1) Quand il y avait dédoublement de l'hétéroside, nous avons évidemment tenu compte de cet acide cyanhydrique glucosidique.

synthétisante précède l'action hydrolysante ou si au contraire ces deux phénomènes se produisent en même temps, avec prédominance de l'un ou de l'autre suivant les conditions, mais à des endroits différents. Même en ne considérant qu'une seule cellule, on peut supposer qu'il y ait synthèse au niveau du cytoplasme ou du chondriome et hydrolyse au niveau du vacuome, celle-là l'emportant sur celle-ci, tout au moins au début de l'action du chloroforme. Ce n'est là évidemment qu'une hypothèse mais des faits analogues ont déjà été signalés par MAIGE à propos de l'amylolyse et l'amylogénèse [148]. C'est donc cette seconde hypothèse qui nous paraît le plus en accord avec les faits observés (en particulier avec le fait qu'au début de l'expérience il y a dégagement d'acide cyanhydrique alors que la méthode biochimique indique une synthèse de l'hétéroside cyanogénétique).

Les essais biochimiques mesureraient donc la différence entre l'action synthétisante et l'action hydrolysante. Au début de l'expérience, il y aurait prédominance de celle-là puis, si l'on prolonge la durée d'action du chloroforme, prédominance de l'hydrolyse.

L'hétéroside synthétisé est-il le prulaurasoside ? Cela est probable, tout au moins quand les indices biochimiques sont voisins de l'indice théorique de cet hétéroside (359). Cependant pour affirmer ce fait, il faudrait extraire et identifier l'hétéroside formé.

Ainsi, chez les feuilles de Laurier-cerise, sous l'influence des vapeurs de chloroforme et dans certaines conditions, il y a formation d'hétéroside et d'acide cyanhydrique. Il y aurait là un exemple de *synthèse in vivo* d'un hétéroside tributaire de l'émulsine sous l'influence de vapeurs anesthésiques. A condition de se placer dans des conditions convenables celles-ci ne provoquent donc pas uniquement une hydrolyse, elles peuvent aussi provoquer une synthèse diastasique.

Des faits analogues ont déjà été signalés par WILLAMAN [199] à propos du Sorgho. Cet auteur avait constaté que des feuilles de Sorgho (qui contiennent elles aussi un hétéroside cyanogénétique : le durrhoside) exposées aux vapeurs de chloroforme produisaient plus d'acide cyanhydrique que des feuilles normales ; il en avait conclu que les anesthésiques stimulaient à la fois l'action hydrolysante et l'action synthétisante des diastases *in vivo*.

Nous verrons d'ailleurs que ce phénomène ne semble pas particulier à l'émulsine et que, sous l'action des différentes va-

peurs étudiées nous avons également obtenu *in vivo* et dans certaines conditions une synthèse d'osides tributaires d'autres glucidases.

Extraction des ferments. — Ces actions *in vivo* étant constatées, il nous reste à préparer les produits fermentaires des lots chloroformés et à comparer leur activité hydrolysante et synthétisante à celles des témoins.

Les ferments des feuilles de Laurier-cerise ont été étudiés par différents auteurs. En plus de l'émulsine et de l'invertine, elles contiennent, d'après MOUTON [160] de la galactosidase β . D'après ARMSTRONG [3], les feuilles de *Prunus Lauro-cerasus* renferment de la prunase et pratiquement pas d'amygdalase (1). Il a constaté que les extraits fermentaires étaient inactifs et qu'il fallait employer les poudres fermentaires elles-mêmes. Les techniques de préparation des produits fermentaires ont été les mêmes que pour l'*Aucuba*.

Salicoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 3 jours
(1) Poudre fermentaire témoin	— 1°16'	— 6'	+ 20'	+ 28'
(2) Poudre fermentaire après 2 heures de CHCl_3	— 1°16'	$\pm 0'$	+ 24'	+ 30'
(3) Poudre fermentaire après 4 heures de CHCl_3	— 1°16'	+ 6'	+ 30'	+ 30'

Les poudres II et III sont nettement plus actives que la poudre I (témoin).

Amygdaloside à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 2 heures	Après 2 jours	Après 5 jours
Poudre fermentaire témoin..	— 44'	— 40'	— 14'	+ 0'
Poudre fermentaire après 4 heures CHCl_3	— 44'	— 40'	— 16'	+ 6'

(1) ARMSTRONG avait réalisé des expériences de courte durée ; en prolongeant le temps d'action, la poudre fermentaire de Laurier-cerise arrive à hydrolyser l'amygdaloside, la vitesse étant simplement beaucoup plus faible que dans le cas du salicoside.

Quant aux extraits fermentaires, ils se sont montrés pratiquement inactifs (le rendement des lots chloroformés était légèrement augmenté par rapport à celui des témoins).

En résumé : Les poudres fermentaires de feuilles de Laurier-cerise sont peu actives vis-à-vis de l'amygdaloside. Elles hydrolysent beaucoup plus rapidement le salicoside, et les poudres soumises à l'action du chloroforme sont plus actives que les poudres fermentaires témoins.

B. — ACTION DE PETITES DOSES DE CHLOROFORME.

Nous avons mis les feuilles de Laurier-cerise dans une atmosphère contenant 1 cm³ de chloroforme par litre pendant 1 jour et 4 jours. Les techniques d'étude employées sont les mêmes que précédemment.

TABLEAU IX. — *Action des vapeurs de chloroforme à faible dose sur les feuilles de Laurier-cerise.*

	Témoin 1 jour	CHCl ³ 1 jour	Témoin 4 jours	CHCl ³ 4 jours
<i>Déviatiou :</i>				
Avant émulsine	— 2°20'	— 2°52'	— 2°24'	— 2°48'
Après émulsine	± 0	— 20'	— 32'	— 1°20'
<i>Sucres réducteurs :</i>				
Avant émulsine	907	1.196	816	1.132
Après émulsine	1.835	2.160	1.600	1.802
<i>Action de l'émulsine :</i>				
Retour de déviation	2°20'	2°32'	1°52'	1°28'
Sucre réducteur formé . .	928	964	784	670
Date de l'expérience . . .	Novembre			

Soit une augmentation de 4 p. 100 en 1 jour et une diminution de 14 p. 100 en 4 jours.

2. *Dosage de HCN total* (en mg. par 100 g. de feuilles fraîches).

	1 jour	4 jours
Lot témoin.....	122	112
Lot chloroformé.....	148	224

L'acide cyanhydrique total a augmenté ; en 4 jours, il a doublé dans le lot chloroformé (l'acide cyanhydrique ainsi dosé représente la somme de l'acide cyanhydrique glucosidique et l'acide cyanhydrique non glucosidique). Les résultats sont de même ordre que ceux obtenus à forte dose (en vapeur saturante).

II. — Action de l'éther sur les feuilles de Laurier-cerise.

On sait que les vapeurs d'éther, comme celles de chloroforme, sont capables de stimuler l'action diastasique *in vivo* et de provoquer un dégagement d'acide cyanhydrique par action sur les feuilles de Laurier-cerise. Mais là encore, tout au moins à notre connaissance, aucune expérience quantitative n'a été faite.

Le plan et les techniques seront identiques à ceux qui ont été suivis pour l'étude de l'action du chloroforme. Nous étudierons l'action de fortes doses (vapeur saturante) et de faibles doses d'éther (atmosphère contenant 1 p. 1000 d'éther).

a) *Action de l'éther en vapeur saturante.* — Cette action *in vivo* de l'activité diastasique a été suivie à la fois par des dosages de prulaurasoside, grâce à des essais biochimiques à l'émulsine et par des dosages d'acide cyanhydrique total.

Les techniques sont absolument les mêmes que pour l'étude du chloroforme. Nous n'y reviendrons donc pas et nous exposerons tout de suite les résultats obtenus.

TABLEAU X. — *Action de l'éther en vapeur saturante sur les feuilles de Laurier-cerise.*

	Témoin 1 heure	Ether 1 heure	Témoin 2 heures	Ether 2 heures	Témoin 4 heures	Ether 4 heures
<i>Déviatiqn :</i>						
Avant émulsine	— 1°	— 1°48'	— 1°14'	— 2.12'	— 1°52'	— 2.8'
Après émulsine	+ 52'	+ 40'	+ 56'	+ 32'	+ 40'	+ 8'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant émulsine	2.082	2.282	1.992	2.082	1.112	1.292
Après émulsine	3.202	3.564	3.112	3.224	2.492	2.572
<i>Action de l'invertine :</i>						
Retour de la déviation	1°52'	2°28'	2°10'	2°44'	2°32'	2°16'
Sucre réducteur formé	1.120	1.282	1.120	1.142	1.380	1.280
Date de l'expérience ..	Février		Février		Novembre	

Variation des hétérosides dédoublables par l'émulsine sous l'influence de l'éther.

I. — 1 heure en vapeur saturante :

S. R. formé sous l'action de l'émulsine : 1.282 mg., soit une augmentation de 14 p. 100 par rapport au témoin.

II. — 2 heures en vapeur saturante :

S. R. formé sous l'action de l'émulsine : 1.142 mg., soit une augmentation de 2 p. 100.

III. — 4 heures en vapeur saturante :

S. R. formé sous l'action de l'émulsine : 1.280 mg., soit une diminution de 7 p. 100.

Dosages d'acide cyanhydrique. (Résultats exprimés en mg. p. 100).

	1 heure	2 heures	3 heures
	—	—	—
Lot témoin	104	102	102
Lot éthéré.....	138	179	174

Les résultats obtenus avec l'éther en vapeur saturante, tant au point de vue des dosages d'acide cyanhydrique que des dosages biochimiques, se rapprochent de ceux obtenus avec le chloroforme dans les mêmes conditions.

1. Suivant le temps d'action, la méthode biochimique indique une synthèse ou une hydrolyse des hétérosides.

2. De plus, les lots éthérés, même après action de l'émulsine, sont encore plus riches en sucre réducteur que les témoins.

3. Enfin, on constate une augmentation de l'acide cyanhydrique total chez les feuilles soumises à l'action des vapeurs d'éther.

4. Nous avons essayé les poudres fermentaires sur le salicoside : les poudres éthérées provoquent une hydrolyse plus rapide que les poudres témoins.

b) *Action de l'éther à faible dose.* — On a fait agir l'éther à la dose de 1 cm³ par litre à la pression ordinaire et à la température de 20°, les témoins étant placés dans des cloches identiques, mais sans éther.

Au bout d'un temps déterminé, une partie des feuilles est stabilisée, épuisée, comme il a été dit précédemment, en vue d'un essai biochimique et on prend soin d'éliminer l'acide cyanhydrique avant l'estimation des sucres réducteurs ; l'au-

tre partie est consacrée au dosage de l'acide cyanhydrique.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux suivants :

TABLEAU XI. — Action de l'éther à petite dose (1 cm³ par litre) sur les feuilles de Laurier-cerise.

	Témoin 4 jours	Ether 4 jours
<i>Déviation :</i>		
Avant émulsine	— 2°24'	— 3°28'
Après émulsine	— 32'	— 1°20'
<i>Sucre réducteur :</i>		
Avant émulsine	816	660
Après émulsine	1600	1600
<i>Action de l'émulsine :</i>		
Retour de la déviation	1°52'	2°8'
Sucre réducteur formé	784	940
Date de l'expérience	Novembre	

Dosage d'acide cyanhydrique total (en mg. par 100 g. de feuilles fraîches) après 4 jours d'éther à faible dose.

	4 heures d'autolyse	48 heures d'autolyse
Lot témoin	112	41
Lot éthéré (4 jours)	133	62

Il y a eu augmentation (environ 16 p. 100) du sucre réducteur formé sous l'influence de l'émulsine et également augmentation de HCN total. Dans ces conditions opératoires, avec les vapeurs d'éther, il y a eu prédominance de l'action synthétisante de l'émulsine *in vivo*. Avec les vapeurs de chloroforme dans les mêmes conditions il y avait prédominance de l'action hydrolysante, cela tient sans doute à ce que l'action du chloroforme est plus rapide, fait déjà observé lors des expériences effectuées en vapeur saturante.

Comme pour le chloroforme, nous avons extrait les produits fermentaires des lots traités et nous avons comparé l'activité à celle des témoins.

N'ayant pas de prulaurasoside à notre disposition, nous avons essayé les produits obtenus sur une solution d'amygdalosite à 2 p. 100. Les extraits fermentaires se sont montrés presque inactifs.

Voici les résultats obtenus avec les poudres fermentaires employées à la dose de un pour cent.

Amygdalosite à 2 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 2 heures	Après 2 jours	Après 5 jours
Poudre témoins	— 1°30'	— 1°20'	— 30'	+ 8'
Poudre « éthérée » 4 jours..	— 1°30'	— 1°22'	— 34'	— 8'

Salicoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 3 jours
Poudre témoin	— 1°16'	— 6'	+ 20'	+ 28'
Poudre éthérée (4 jours)....	— 1°16'	— 8'	+ 16'	+ 24'

Dans ce cas, les poudres fermentaires obtenues sont d'activité sensiblement identique à celle des témoins.

III. — Action du formol sur les feuilles de Laurier-cerise.

Nous venons de voir l'action analogue exercée par le chloroforme et l'éther, provoquant tous deux *in vivo* la stimulation, l'activation des actions diastasiques (hydrolysante et synthétisante).

Parmi les nombreux corps, dont MIRANDE [159] étudia l'action sur les végétaux, le formol était, comme nous l'avons déjà vu à propos de l'*Aucuba*, un des rares corps qui ne provoquaient pas le dédoublement diastatique *in vivo*. Par la suite, GUÉRIN et LORMAND [114] reprenant ces expériences, mais en employant de petites doses et en procédant avec des feuilles jeunes, obtinrent le dégagement cyanhydrique à la condition de retirer les feuilles de Laurier-cerise de l'atmosphère formolée et en les remplaçant dans d'autres flacons ne contenant pas de formol (1). Ils obtinrent ainsi le rougissement du papier micro-sodé de GUIGNARD.

Quoi qu'il en soit, on voit que le formol, même au point de vue qualitatif, semble se comporter autrement que le chloroforme et l'éther. De plus, le formol est connu comme un inhibiteur de l'émulsine *in vitro* (BOURQUELOT [33]). Quelle est son action *in vivo* ? Que devient l'émulsine sous son influence ? A notre connaissance, aucune expérience quantitative n'a été faite dans ce sens. C'est pour répondre à ces questions que nous avons fait agir des vapeurs de formol, dans différentes conditions, sur des feuilles de Laurier-cerise.

Le plan adopté est toujours le même que pour le chloroforme et l'éther. Nous avons apprécié l'action sur l'émulsine, indirectement, par l'étude des variations des hétérosides sous l'influence du formol. Et, comme précédemment, ces variations ont pu être évaluées grâce à la méthode biochimique de BOURQUELOT et aussi par des dosages d'acide cyanhydrique.

(1) Sinon il y a combinaison de l'acide cyanhydrique dégagé avec la formaldéhyde.

TABLEAU XII. — Action du formol en vapeur saturante sur les feuilles de Laurier-cerise.

	Témoin 1 heure	Formol 1 heure	Témoin 2 heures	Formol 2 heures	Témoin 4 heures	Formol 4 heures
<i>Déviatiou :</i>						
Avant émulsine	— 1°	— 1°30'	— 1°	— 1°18'	— 2°	— 2°
Après émulsine	+ 1°16'	+ 42'	+ 52'	+ 42'	+ 10'	+ 40'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant émulsine	2082	2240	2082	2040	1853	1056
Après émulsine	3202	3297	3202	3224	2753	2042
<i>Action de l'émulsine :</i>						
Ret. de la déviation . . .	2°16'	2°12'	1°52'	2°	2°10'	2°40'
S. R. formé	1120	1057	1120	1184	900	986
Date de l'expérience :	Février				Novembre	

Variations des hétérosides dédoublables par l'émulsine sous l'influence du formol.

1. Au bout d'une heure en vapeur saturante. — S.R. formé sous l'action de l'émulsine : 1057 mg. soit une *diminution* de 5 p. 100 par rapport au témoin.

2. Au bout de deux heures en vapeur saturante. — S.R. formé sous l'action de l'émulsine : 1184 mg. soit une *augmentation* de 5 p. 100 par rapport au témoin.

3. Au bout de quatre heures en vapeur saturante. — S.R. formé sous l'action de l'émulsine : 986 mg. soit une *augmentation* de 9 p. 100 par rapport au témoin.

Il y a donc peu de changement par rapport aux témoins. Au début de l'action du formol, on constate une légère hydrolyse de l'hétéroside. Quant à l'augmentation de sucre réducteur constatée au bout de 2 heures ou de 4 heures, elle nous paraît due à ce fait qu'il y a eu hydrolyse partielle chez le témoin tandis que le lot formolé n'a pas varié.

Les dosages d'acide cyanhydrique sur les feuilles traitées pendant 1 heure, 2 heures, 4 heures, par des vapeurs de for-

mol, effectués après 4 heures d'autolyse, suivant la technique indiquée à propos de l'action du chloroforme, nous ont donné des chiffres très faibles.

En effet, les dosages étaient effectués dans le ballon contenant le formol. Celui-ci empêche la libération de l'acide cyanhydrique. Si au contraire, on élimine le formol en changeant les feuilles de récipient, puis en faisant une autolyse et une distillation en l'absence de formol, on obtient pour les lots formolés des chiffres analogues à ceux des lots témoins.

	1 heure	2 heures	4 heures
Lot témoin.....	112	104	102
Lot formolé.....	17	10	10
Lot formolé après élimin. du formol..	116	112	110

(HCN est exprimé en milligrammes pour cent grammes de feuilles fraîches).

b) Voici maintenant les résultats obtenus avec de *faibles doses de formol*.

Les feuilles de Laurier-cerise étaient maintenues pendant un temps déterminé dans une atmosphère contenant 1/1000 de formol.

TABLEAU XIII. — *Action du formol à faible dose sur les feuilles de Laurier-cerise.*

	Témoin 4 jours	Formol 4 jours
<i>Déviation :</i>		
Avant émulsine.....	— 2°24'	— 2°48'
Après émulsine.....	— 32'	— 42'
<i>Sucre réducteur :</i>		
Avant émulsine.....	816	720
Après émulsine.....	1.600	1.524
<i>Action de l'émulsine :</i>		
Sucre réducteur formé.....	784	804
Retour de la déviation.....	1°52'	2°6'
Date de l'expérience.....	Novembre	

Dans ces conditions également, il y a peu de changement par rapport au témoin. La légère variation constatée est de l'ordre des erreurs d'expériences (1).

Essai des produits fermentaires correspondants.

Les extraits fermentaires, obtenus par la technique précédemment décrite, s'étant montrés inactifs, nous avons étudié les poudres fermentaires.

Amygdalosite à 1 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 3 jours	Après 5 jours
Poudre témoin.....	— 44'	— 44'	+ 8'
Poudre après 1 heure formol (vap. sat.)	— 44'	— 22'	— 8'
Poudre après 2 heures formol.....	— 44'	— 20'	— 8'
Poudre après 4 heures formol... ..	— 44'	— 26'	— 8'

Les poudres fermentaires formoïées sont atténuées par rapport au témoin.

(1) Les résultats sont différents de ceux obtenus avec les feuilles d'*Aucuba*. Dans ces conditions il y avait une hydrolyse marquée de l'hétéroside tributaire de l'émulsine.

IV. — Action des vapeurs d'acroléine sur les feuilles de Laurier-cerise.

A. — EN VAPEUR SATURANTE.

L'action des vapeurs d'acroléine ou aldéhyde acrylique sur les végétaux a été étudiée, au point de vue qualitatif, par GUÉRIN et LORMAND [114]. Ces auteurs, reprenant les expériences de MIRANDE [159] étudièrent l'action des aldéhydes sur les végétaux et, en particulier sur les feuilles de Laurier-cerise et d'*Aucuba*. Avec de petites doses (10 à 20 gouttes par litre) ils n'obtinrent pas de dégagement de HCN avec les feuilles de Laurier-cerise et ils attribuent ce fait, non à l'inactivation de ferment, mais à la fixation de l'acide cyanhydrique par l'aldéhyde. En effet, si l'on retire les feuilles de l'atmosphère aldéhydrique et qu'on transvase dans un autre récipient avec du papier picro-sodé de GUIGNARD, le papier réactif rougit sous l'influence de l'acide cyanhydrique dégagé. Avec de fortes doses (50 gouttes par litre) ces mêmes auteurs constatèrent que l'acroléine annihile complètement l'émulsine. Mêmes broyées, les feuilles de Laurier-cerise ne donnent plus d'acide cyanhydrique. Elles n'en ont pas produit non plus au début de l'expérience. Elles n'en donnent que si on ajoute de l'émulsine neuve.

Nous avons repris ces intéressantes expériences au point de vue quantitatif, toujours au moyen des essais biochimiques à l'émulsine.

TABLEAU XIV. — Action de l'acroléine en vapeur saturante sur les feuilles *Le Laurier-cerise*.

	Témoin 1 heure	Acroléine 1 heure	Témoin 2 heures	Acroléine 2 heures	Témoin 4 heures	Acroléine 4 heures
<i>Déviation :</i>						
Avant émulsine	— 2°10'	— 2°	— 2°16'	— 2°52'	— 1°52'	— 2°
Après émulsine	+ 10'	+ 10'	+ 1°	+ 35'	+ 48'	+ 40'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant émulsine	1.853	1.853	1.693	1.995	1.292	1.252
Après émulsine	2.653	2.653	2.663	2.918	2.572	2.492
<i>Action de l'émulsine :</i>						
R. t. de la déviation .	2°20'	2°10'	3°16'	3°26'	2°40'	2°40'
S. R. formé	800	800	970	923	1.280	1.240
Date de l'expérience.	Novembre		Janvier		Novembre	

Il n'y a guère de changement par rapport aux témoins. Tout au plus peut-on constater une très légère hydrolyse de l'hétéroside dédoublable au bout de deux heures et de quatre heures ; et ces différences peuvent être attribuées aux erreurs d'expériences.

Les dosages d'acide cyanhydrique après élimination de l'acroléine nous conduisent à des conclusions de même ordre : les lots traités sont identiques aux lots témoins au point de vue de leur teneur en hétéroside. Les feuilles ont été en quelque sorte stabilisées par les vapeurs d'acroléine, l'action diastatique, loin d'être stimulée comme dans le cas du chloroforme et de l'éther, a été inhibée.

B. — ACTION DE FAIBLES DOSES D'ACROLÉINE.

Les doses employées étant très fortes, nous avons voulu voir l'effet de plus petites doses. Nous avons donc mis des feuilles de *Laurier-cerise* pendant un temps déterminé dans une atmosphère contenant 1/1000 d'aldéhyde acrylique.

Les feuilles ont été stabilisées immédiatement au sortir de la cloche ; nous insistons sur ce fait, car si on attendait un certain temps avant de stabiliser, on aboutirait, comme nous

avons pu le vérifier, à des résultats différents. En effet, dès que les feuilles ne sont plus soumises à l'action de l'acroléine, il se produit une hydrolyse. Il en est de même si on fait agir le chloroforme après l'acroléine. Ces faits tendraient à prouver que les ferments ne sont pas tués, mais simplement inhibés par l'acroléine qui, tout au moins à faible dose et pour des temps assez courts, n'agirait que par sa présence. Nous reparlerons d'ailleurs de ce phénomène lors de l'action de l'acroléine sur l'émulsine *in vitro*.

TABLEAU XV. — Action de l'acroléine à faible dose (1/1000) sur les feuilles de Laurier-cerise.

	Témoin 4 jours	Acroléine 4 jours
<i>Déviation :</i>		
Avant émulsine.....	— 1°52'	— 2°
Après émulsine.....	+ 48'	+ 40'
<i>Sucre réducteur :</i>		
Avant émulsine.....	1.292	1.252
Après émulsine.....	2.572	2.492
<i>Action de l'émulsine :</i>		
Retour de la déviation	2°40'	2°40'
Sucre réducteur formé	1.280	1.240
Date de l'expérience	Novembre	

La très faible hydrolyse observée est de l'ordre des erreurs d'expérience.

Sous l'influence de l'acroléine, même à faible dose, il n'y a pas eu d'hydrolyse du prulaurasoside (ou tout au moins, celle-ci est très faible (1)).

L'acroléine est donc inhibitrice de l'émulsine *in vivo*.

Essai des produits fermentaires. — Dans ces conditions, il était intéressant de voir si les poudres fermentaires extraites de ces lots allaient être inactivées. Les ferments étaient-ils détruits d'une façon irréversible ou au contraire la régénération

(1) Ceci est en accord avec les expériences de GUÉRIN et LORMAND, car on sait que la réaction de GUIGNARD est très sensible et qu'il suffit de traces de HCN pour obtenir le rougissement du papier picro-sodé.

est-elle possible ? Notons dès maintenant que les poudres fermentaires extraites après action de l'acroléine étaient actives. Le phénomène d'inactivation par l'acroléine est donc réversible.

L'acroléine n'agit que par sa présence. Si on l'élimine, le ferment recouvre son activité (tout au moins partiellement).

Nous avons essayé les différentes poudres fermentaires sur le salicoside et l'amygdaleside (selon les travaux d'ARMSTRONG [3], l'action sur la prulaurasine aurait été plus nette ; mais nous n'en avons pas à notre disposition).

I. — *Essai des poudres fermentaires à la dose de 1 p. 100 sur l'amygdaleside à 2 p. 100.*

Déviation	Initiale	Après 1 heure	Après 2 heures	Après 2 jours	Après 5 jours
Poudre témoin.....	— 1°30'	— 1°24'	— 1°20'	— 30'	+ 8'
Poudres acroléinées :					
1 heure.....	— 1°30'	— 1°28'	— 1°20'	— 30'	± 0
2 heures.....	— 1°30'	— 1°28'	— 1°20'	— 30'	— 2'
4 heures.....	— 1°30'	— 1°24'	— 1°20'	— 30'	— 2'
4 jours (faible dose).	— 1°30'	— 1°14'	— 1°20'	— 32'	— 4'

Bien que la poudre témoin soit elle-même peu active sur l'amygdaleside, on voit néanmoins que les poudres acroléinées sont encore moins actives que celle-ci.

II. — *Essai des poudres fermentaires sur salicoside à 1 p. 100.*

Déviation	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 3 jours	Après 10 jours
Poudre témoin.....	— 1°16'	— 6'	+ 20'	+ 28'	+ 30'
Poudres acroléinées (vapeur saturante) :					
1 heure.....	— 1°16'	— 10'	+ 12'	+ 20'	+ 30'
2 heures.....	— 1°16'	— 12'	+ 12'	+ 20'	+ 26'
4 heures.....	— 1°16'	— 42'	— 30'	+ 10'	+ 20'
4 jours (faible dose).	— 1°16'	— 14'	— 54'	— 54'	— 16'

Nous avons laissé de côté les extraits fermentaires trop peu actifs.

Les poudres acroléinées sont donc atténuées par rapport aux poudres témoins, néanmoins elles conservent une certaine activité, alors que les feuilles soumises à l'action des vapeurs d'acroléine et broyées ne donnaient plus de dégagement d'acide cyanhydrique, à ce moment le ferment était complètement inactif, il a recouvré une partie de son activité lors de la préparation de la poudre fermentaire — peut-être est-ce par élimination de l'acroléine lors des lavages à l'alcool et à l'éther.

En résumé lors de nos expériences avec les feuilles de *Laurier cerise* :

1° *Sous l'influence du chloroforme* en vapeur saturante, nous avons constaté, à l'aide de la méthode biochimique, une augmentation, puis, si l'on prolonge l'action du chloroforme, une diminution des hétérosides dédoublables par l'émulsine, ce qui correspondrait à une synthèse puis à une hydrolyse du prulaurasoside *in vivo*. Si l'on dose l'acide cyanhydrique total (glucosidique et non glucosidique), on constate toujours une augmentation de ce dernier. Cette observation et le fait que les sucres réducteurs sont augmentés même après action de l'émulsine, nous conduisent à envisager l'hypothèse que la méthode biochimique ne mesurerait que la différence entre la synthèse et l'hydrolyse des hétérosides *in vivo* sous l'influence du chloroforme. Au début, il y aurait prédominance de l'action synthétisante puis, si l'on prolonge l'action du chloroforme, prédominance de l'action hydrolysante.

Des faits de même ordre se retrouvent en employant de faibles doses de chloroforme.

Le chloroforme, à l'état de vapeur, stimule donc à la fois l'action hydrolysante et l'action synthétisante de l'émulsine *in vivo*

2° *L'éther*, à l'état de vapeur, provoque des phénomènes analogues, cependant son action est moins rapide que celle du chloroforme.

Quant aux produits fermentaires correspondants, nous ne parlerons que des poudres, les extraits s'étant montrés inactifs. Les poudres fermentaires, chloroformées ou éthérées,

essayées sur le salicoside se sont montrées généralement plus actives que les témoins.

3° *Le formol et l'acroléine*, aussi bien à faible dose qu'à forte dose (en vapeur saturante), se sont révélés comme des inhibiteurs de l'action de l'émulsine *in vivo*. Tout au plus dans certains cas peut-on constater une très légère hydrolyse des hétérosides.

Les poudres fermentaires correspondantes sont atténuées par rapport aux témoins.

Les résultats obtenus avec le Laurier-cerise comportent donc quelques différences avec ceux obtenus avec les feuilles d'*Uncuba*.

CONCLUSIONS.

Dans cette étude sur l'émulsine *in vivo* sous l'influence, d'une part, du chloroforme et de l'éther, d'autre part, du formol et de l'acroléine, nous avons suivi l'action sur l'émulsine par les variations des quantités d'hétéroside et aussi par l'obtention de produits fermentaires et la détermination de leur activité par rapport aux témoins.

Constatons tout de suite que les résultats obtenus sont différents suivant le végétal envisagé et suivant les conditions opératoires. Quand on suit quantitativement les variations des hétérosides sous l'influence de différentes vapeurs, on s'aperçoit rapidement que le phénomène est beaucoup plus complexe qu'il ne paraît au premier abord. En effet, on pourrait être tenté de croire (comme l'ont fait de nombreux auteurs n'ayant étudié le phénomène qu'au point de vue qualitatif) que, sous l'influence de ces différentes vapeurs il y a dédoublement des hétérosides et que ce dédoublement est d'autant plus marqué que l'action a été plus prolongée. Ce fait, qui peut être vrai dans certains cas et dans certaines conditions, ne doit pas être généralisé car il faut tenir compte de nombreux facteurs. Parmi ceux-ci nous citerons l'âge du végétal (les feuilles jeunes de l'*Aucuba* noircissent plus facilement que les feuilles âgées), l'espèce employée et sa composition chimique, (les feuilles de Laurier-cerise ne se comportent pas comme celles d'*Aucuba*), les substances employées (le chloroforme et l'éther ne donnent pas les mêmes résultats que le formol et l'acroléine), les conditions opératoires (les faibles doses même prolongées ne produisent pas toujours les mêmes effets que de fortes doses).

Parmi les quatre substances que nous avons étudiées au point de vue de leur influence sur l'émulsine *in vivo*, nous mettons dans un premier groupe le chloroforme et l'éther, qui, *in vivo*, sont des activateurs des réactions diastasiques et, dans un deuxième groupe le formol et l'acroléine qui, tout au moins à fortes doses, sont des inhibiteurs de ces mêmes réactions diastasiques.

Les résultats obtenus avec les feuilles de Laurier-cerise et d'*Aucuba* étant différents, nous les exposerons séparément.

1. Chez le *Laurier-cerise*, sous l'influence de l'éther et du chloroforme, nous avons constaté :

1. Aussi bien à faible dose qu'à forte dose, une augmentation de l'acide cyanhydrique total par rapport aux feuilles non traitées ;

2. Suivant les conditions opératoires, la méthode biochimique indique une hydrolyse ou une synthèse des hétérosides.

3. Les produits fermentaires obtenus sont légèrement plus actifs que chez les témoins.

Il semble donc que chez les feuilles de *Laurier-cerise*, les vapeurs employées stimulent non seulement l'activité hydrolysante, mais aussi dans certaines conditions l'activité synthétisante de l'émulsine. Par quel mécanisme ? Nous essaierons d'en discuter dans nos conclusions générales, quand nous aurons étudié l'action de ces substances *in vitro*.

Quant aux vapeurs de formol et à l'acroléine, aussi bien à fortes doses qu'à faibles doses, elles ne provoquent guère de variations des hétérosides. Tout au plus, dans certains cas, peut-on constater une légère hydrolyse. En leur présence, les réactions diastasiques sont suspendues.

Les produits fermentaires des feuilles traitées, plus actifs que les témoins, dans les cas du chloroforme et de l'éther, sont moins actifs dans les cas du formol et surtout de l'acroléine.

II. Chez l'*Aucuba* : les vapeurs de chloroforme et d'éther provoquent en quelques heures une hydrolyse presque totale de l'hétéroside (l'éther agit un peu moins rapidement que le chloroforme).

On arrive aux mêmes conclusions en employant de faibles doses d'éther ou de chloroforme, à condition de prolonger la durée de l'expérience. Nous n'avons pas constaté de synthèse ; il semble que, quelle que soit la dose employée, il y ait surtout activation dans le sens de l'hydrolyse, celle-ci étant d'autant plus marquée que la durée d'action a été plus longue.

En ce qui concerne les produits fermentaires, il y a augmentation de l'activité pour les lots traités par le chloroforme et l'éther.

Quant aux vapeurs de formol et d'acroléine, elles nous ont donné des résultats différents suivant la dose employée : en va-

peur saturante il n'y a pas eu hydrolyse (ou tout au moins cette hydrolyse était très faible et n'augmentait pas avec la durée de l'expérience) ; par contre, à faible dose et par action prolongée, il y a eu destruction de l'aucuboside, celle-ci pouvant atteindre la presque totalité de l'hétéroside avec l'acroléine. A faible dose, le formol et l'acroléine se comportent chez l'*Aucuba* comme des activateurs de l'émulsine ; à forte dose ce sont au contraire des inhibiteurs ; suivant la dose employée il y a des effets contraires.

Quant aux poudres fermentaires obtenues après action du formol et de l'acroléine, en vapeur saturante, elles se sont montrées nettement atténuées par rapport aux témoins.

B. — Etude de l'émulsine « in vitro »

Après une étude *in vivo*, nous avons envisagé l'action des mêmes substances organiques volatiles sur l'émulsine, extraite des tissus, à différents degrés de pureté. Nous avons également fait agir l'éther ou le chloroforme, le formol ou l'acroléine aux différents stades de la préparation.

Ces diverses expériences ont été faites afin de voir si l'action des agents chimiques envisagés était de même ordre *in vitro* qu'*in vivo*.

Nous avons voulu voir également si l'action préalable de ces substances ne favorisait pas l'extraction de l'émulsine.

Dans les cas d'inhibition, nous avons cherché à déterminer le mécanisme de cette inhibition et le degré d'inhibition pour les différents ferments de l'émulsine, ceci en vue de la différenciation de ces ferments.

Préparation de différents émulsines.

Notre étude a porté sur des émulsines d'origine différente : émulsine d'amandes douces, de graines de Lin et d'*Aspergillus*.

Pour l'émulsine d'amandes, afin de voir l'influence des impuretés, nous avons employé différentes préparations dont nous avons titré l'activité.

Aussi avant d'étudier l'action du chloroforme de l'éther, du formol et de l'acroléine, sur l'émulsine, allons-nous exposer la préparation des différents produits employés.

ÉMULSINE D'AMANDES (1).

L'émulsine a été retirée des amandes pour la première fois, en 1837, par WÖHLER et LIEBIG [203], puis son étude fut approfondie par ROBIQUET [183] qui, en 1838, lui donna le nom

(1) Ayant déjà parlé de l'émulsine lors des généralités sur les glucidases, nous n'envisagerons ici que les techniques de préparation.

de synaplaste. Le mode de préparation indiqué par ROBIQUET consistait à faire macérer le tourteau d'amande dans de l'eau distillée ; puis après expression, le liquide était additionné d'acide acétique pour précipiter « la matière albumineuse » et d'acétate de plomb pour précipiter « la gomme ». Après élimination du plomb, on ajoutait de l'alcool et on recueillait le précipité obtenu. Diverses modifications ont été apportées à ce procédé et la préparation-type aujourd'hui couramment adoptée est celle qui a été proposée en 1899 par H. HÉRISSEY [131]. C'est cette technique, légèrement modifiée par G. DE SAINT-STÉBAN [87], que nous avons adoptée. Les amandes douces sont plongées, par fraction de 250 grammes, dans l'eau bouillante pendant une minute et mondées ; on enlève ainsi la pellicule contenant du tanin qui précipiterait l'émulsine. On broie au hachoir universel et on met le tout à macérer dans deux fois son poids d'eau toluénée ou chloroformée — on laisse 48 heures en agitant fréquemment.

Le mélange est passé sur une gaze, le marc est exprimé. On ajoute de l'acide acétique (environ 10 cm³ pour 1 kg. d'amandes) afin de précipiter la caséine et détruire l'émulsion. On filtre sur filtre mouillé.

Le filtrat (environ 1.250 cm³ pour 1 kg. d'amandes) est précipité par addition de 3 volumes d'alcool à 95° ; on laisse déposer 12 heures et on recueille sur un entonnoir de Büchner ; le précipité est lavé à l'alcool, puis à l'éther, et desséché dans le vide sulfurique. On obtient des lames cornées jaunâtres qu'on pulvérise finement. Le rendement est d'environ 15 grammes par kg. d'amandes ; il peut atteindre, avec certaines amandes, 18 à 20 grammes.

C'est ce produit que nous avons employé dans la plupart de nos expériences et que nous appellerons émulsine type ou émulsine Hérissey.

Nous avons préparé aussi des *émulsines purifiées*.

Pour obtenir ces émulsines purifiées, plusieurs méthodes peuvent être suivies : celle de OHTA [166] qui, par digestion pepsique énergique arrive à obtenir une émulsine ne donnant plus la réaction des matières protéiques, mais peu active.

Par précipitation alcoolique d'extrait aqueux puis par dialyse, HELFERICH [126] a obtenu des préparations actives exemptes d'albumines.

Mais la méthode que nous avons adoptée à cause de son rendement et de l'activité élevée du produit obtenu est celle de

WILLSTÄTTER [200]. WILLSTAETTER montra que les anciens procédés d'extraction en milieu neutre ou légèrement acide ne convenaient pas, car, dans ces conditions, le ferment reste fortement lié aux tissus, tandis qu'une solution faiblement ammoniacale dissout entièrement le ferment.

La technique employée a été la suivante :

a) *Préparation d'une poudre dégraissée.* — Les amandes sont mondées après avoir été plongées une minute dans l'eau bouillante. Elles sont broyées puis passées à la presse hydraulique afin d'éliminer la plus grande partie de l'huile. Le marc est lixivié à l'éther. On sèche et on moud (au moulin à café). On épuise de nouveau à l'éther. On dessèche dans le vide sulfurique.

600 grammes d'amandes nous ont donné 200 grammes de poudre dégraissée.

b) 100 grammes de poudre déshuillée sont traités par 250 cm³ de solution décimorale d'ammoniaque. On agite (à l'aide d'un agitateur mécanique) pendant 5 heures. On centrifuge. Le résidu est agité avec 100 cm³ d'eau et 100 cm³ d'ammoniaque décimorale. On centrifuge. On fait encore trois extractions avec de l'eau ammoniacale (quelques gouttes d'ammoniaque pour 100 cm³ d'eau), on réunit les liquides. On précipite la caséine par l'acide acétique (60 cm³ N/2) on ajoute 30 p. 100 d'alcool à 95°, on filtre, on ajoute 4 volumes d'alcool à 95° au filtrat — le précipité recueilli après 12 heures est lavé à l'alcool, à l'éther et enfin desséché dans le vide sulfurique.

Les 200 grammes de poudre ainsi traités nous ont donné 7 grammes d'émulsine purifiée.

Nous avons encore poussé la purification plus loin en dissolvant 3 g.,50 d'émulsine. WILLSTAETTER dans 100 cm³ d'eau distillée ; on filtre au bout de deux heures et on ajoute 4 volumes d'alcool au filtrat. On obtient ainsi 2 g.,30 d'émulsine Willstaetter purifiée. Nous avons donc trois émulsines :

Emulsine Hérissé ou émulsine type.

Emulsine Willstaetter.

Emulsine Willstaetter purifiée.

ESSAI DES ÉMULSINES.

L'activité de ces différentes émulsines a été déterminée quantitativement par rapport à une solution de 2 p. 100 de salicoside d'après la méthode de HELFERICH [128] d'ailleurs voisine de celle de WILLSTAETTER [200] qui procède avec l'amygdalosite (1). Mais cette méthode nous a paru moins commode que celle d'HELPERICH. Dans celle-ci, l'activité de l'émulsine est exprimée par la « valeur temps » (*Zeitwert*). Cette valeur temps, c'est le nombre de minutes que met une quantité déterminée d'émulsine pour dédoubler 50 p. 100 du salicoside mis en œuvre à 30° et au pH optimum (4,2). On détermine donc l'activité de l'émulsine par rapport à sa β glucosidase. Si l'on admet avec HUDSON et PARDIE [136] que l'hydrolyse du salicoside par la salicosidase est une réaction monomoléculaire on a :

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{A - E}{A_t - E}$$

(t est exprimé en minutes).

A = déviation initiale.

E = déviation finale.

A_t = déviation après t minutes.

K = Constante d'hydrolyse.

On multiplie K par 10⁵ pour éviter des chiffres décimaux — de cette équation on peut tirer le temps t (ou *Zeitwert*) pour 50 p. 100 d'hydrolyse.

$$t = \frac{\log. 2}{K}$$

On prépare la solution suivante :

Salicoside	2 g.,50
Acétate de sodium décinormal	10 cm ³
Acide acétique décinormal	10 cm ³
Eau distillée Q.S.p.	100 cm ³

(On a une solution de salicoside à 2,5 p. 100 tamponnée à pH = 4,6 dont on détermine la déviation polarimétrique A).

D'autre part, on fait une « solution » d'émulsine dont 1 cm³

1) Par dosage des sucres réducteurs après élimination de HCN par distillation, ou au bain-marie bouillant.

= 10 mg. d'émulsine (1). A 20 cm³ de la solution de salicoside on ajoute 5 cm³ (= 50 mg. d'émulsine) de solution fermentaire (le titre final en salicoside est de 2 p. 100). On met un temps déterminé à l'étuve à 30°. On arrête l'hydrolyse en ajoutant un gramme de carbonate de potassium. On filtre. On examine de nouveau au tube de deux décimètres. On a A_t (t étant exprimé en minutes, et variant généralement entre 30 et 120 suivant l'activité du produit à essayer).

Voici un exemple avec une émulsine type (méthode Hérissey).

Au bout de deux heures la déviation obtenue était — 1°,03 (déviation initiale 2°,51 — déviation finale + 1°,33).

$$K = \frac{1}{120} \log \frac{-2,51-1,33}{-1,03-1,33} = \frac{1}{120} \log \frac{3,84}{2,36}$$

$$\log 3,84 = 0,584$$

$$\log 2,36 = 0,372$$

$$\text{Colog } 2,36 = \overline{1,628}$$

$$K = \frac{1}{120} (\log 3,84 + \text{colog } 2,36)$$

$$K = \frac{1}{120} (0,584 + \overline{1,628}) = \frac{1}{120} 0,212 = 0,00176$$

$$t = \frac{\log 2}{K} = \frac{0,30103}{0,00176} = 171 \text{ minutes}$$

(ou Zeitwert).

Pour l'émulsine Willstaetter, nous avons trouvé t (ou *Zeitwert*) = 22.

Les chiffres obtenus sont comparables à ceux qui sont donnés par WILLSTAETTER [200] et par HELFERICH [128].

ÉMULSINE DE GRAINE DE LIN OU LINASE (2).

On croyait, après les premières recherches de LIEBIG et WÖHLER, que l'émulsine était un principe spécial aux amandes. Des recherches ultérieures ont montré que l'émulsine, complexe fermentaire dont la β glucosidase n'est qu'un des constituants, existe chez de nombreux végétaux.

(1) Si cette solution possède une déviation propre on en tiendra compte dans les calculs.

(2) Le terme linase que nous continuons à employer à la suite de JORISSEN [139], DUNSTAN et HENRY [90], ARMSTRONG [5], est en réalité un mot impropre pour désigner l'ase dédoublant l'hétéroside cyanogénétique de la graine de lin : le linamaroside — on devrait dire linamarosidase suivant la nouvelle nomenclature.

Notons cependant que si on peut mettre en évidence l'émulsine dans de nombreuses poudres fermentaires, il n'est pas toujours facile d'obtenir un extrait fermentaire actif (c'est ce que nous avons constaté au cours de nos expériences sur le Laurier-cerise).

Nos expériences ont porté sur des graines de Lin (1). Ces graines sont très riches en mucilage et, tout au moins au début, on ne peut pas suivre la même technique que pour les amandes. Après divers tâtonnements nous nous sommes arrêté à la technique suivante :

Nous avons employé comme matière première de la farine de lin privée partiellement de téguments par tamisage. La macération a lieu dans de l'eau glycinée (30 à 40 p. 100 en volume) pendant 48 heures en agitant fréquemment. On passe sur une gaze, on exprime, on ajoute de l'acide acétique (1 cm³ par 100 grammes de farine de lin). On filtre sur papier et on ajoute 4 volumes d'alcool à 95°. On obtient ainsi une poudre jaunâtre, hygroscopique. Le rendement a été d'environ 1 p. 100 et la valeur temps (*Zeitwert*) était égale à 463.

EMULSINE D'*Aspergillus*.

Enfin, pour juger de l'action *in vitro* de nos diverses substances, nous avons encore préparé une émulsine d'une autre origine, celle d'*Aspergillus*. Nous avons employé pour nos expériences du liquide et des poudres fermentaires.

Le liquide d'*Aspergillus* a été obtenu par la méthode classique. On cultive le champignon sur liquide de Raulin à l'étuve à 30°. Lorsque le mycélium noircit, on enlève par siphonage le liquide nutritif et on le remplace à deux ou trois reprises par de l'eau distillée qu'on laisse chaque fois au moins deux heures au contact du mycélium. On remplace alors par de l'eau distillée qu'on laisse pendant trois jours. C'est ce liquide qu'on recueille. La poudre fermentaire d'*Aspergillus* est obtenue à partir du mycélium de la manipulation précédente. On sèche entre deux feuilles de papier filtre ; on laisse 24 heures en contact avec de l'alcool à 95° ; on essore à la trompe. On lave à l'alcool, puis à l'éther. On sèche à l'étuve et on pulvérise au moulin.

(1) Nous avons d'abord tenté d'extraire de l'émulsine des noisettes, mais le rendement était faible ; il en était de même de l'activité.

Action du chloroforme sur l'émulsine.

ÉMULSINE D'AMANDES.

Nous avons envisagé tout d'abord l'action du chloroforme au cours des différents stades de préparation de l'émulsine. Certaines expériences où l'on fait agir le chloroforme sur les amandes elles-mêmes pourraient évidemment être considérées comme une action sur l'émulsine *in vivo*. Néanmoins, pour la commodité de l'exposition, nous avons laissé ces expériences dans le chapitre de l'émulsine *in vitro*.

Des amandes douces, débarrassées de leur tégument, en les plongeant une minute dans l'eau bouillante, sont mises à macérer dans du chloroforme pendant 12 heures. On y ajoute 80 cm³ d'eau distillée et on laisse 12 heures, puis on met le tout dans une ampoule à decantation, on recueille la solution aqueuse qu'on amène à 100 cm³. Le chloroforme, ayant provoqué plasmolyse et exolyse, on obtient ainsi un exolysat. Le témoin est obtenu par macération de la même quantité d'amandes dans 80 cm³ d'eau distillée ; au bout de 24 heures, on recueille le liquide et ajuste à 100 cm³. L'exolysat s'est montré plus actif que le liquide témoin, ce liquide témoin était d'ailleurs peu actif, il en était de même des liquides obtenus en milieu hypertonique (provoquant la plasmolyse) ; par contre, nous avons obtenu un liquide aussi actif que l'exolysat chloroformique en ajoutant à l'eau 1 g. de pancréatine.

De ces expériences on peut tirer les conclusions suivantes :

1. les amandes non broyées ne cèdent que des traces d'émulsine à l'eau distillée.

2. L'exolysat chloroformique est par contre plus riche en ferment.

3. Les solutions hypertoniques, plasmolysantes, ne donnent pas des liquides plus actifs que l'eau distillée ; le chloroforme n'agit donc pas uniquement par plasmolyse.

4. La pancréatine semble libérer, tout au moins partiellement, l'émulsine, vraisemblablement en dissociant un complexe, peut être de nature lipido-protidique.

D'autre part, nous avons fait agir le chloroforme en vapeur saturante pendant 4 heures sur des amandes débarrassées de leurs téguments et broyées au hachoir universel ; ensuite on fait macérer dans de l'eau distillée. 250 grammes d'amandes débarrassées de leur épisperme, broyées puis soumises à l'ac-

tion du chloroforme en vapeur saturante pendant 4 heures, ont été laissées en contact avec 500 cm³ d'eau distillée additionnée de quelques gouttes de toluène. On passe sur une gaze et on exprime légèrement, on obtient 425 cm³ de liquide (1) (alors que le témoin ne donne que 375 cm³). On précipite la caséine par l'acide acétique. On filtre et on ajoute 3 volumes d'alcool à 95°. On recueille le précipité après 24 heures. Celui-ci est desséché dans le vide sulfurique. Il pèse 4 g.,50 (avec le témoin, on obtient seulement 3 g.,50 de produit fermentaire) il y a donc eu augmentation du rendement par traitement au chloroforme.

Nous avons essayé l'activité du produit obtenu sur le salicose ; elle est identique à celle du témoin.

L'émulsine, même laissée plusieurs jours en vapeur saturante de chloroforme, n'a pas été modifiée quant à son activité fermentaire. Il est bien connu également que le chloroforme ajouté aux liquides fermentaires contenant de l'émulsine ne modifie pas leur activité hydrolysante (2). Le chloroforme est donc inactif sur l'émulsine *in vitro*, tout au moins à froid, car à chaud celle-ci est détruite par épuisement au Soxhlet ; mais dans ce cas la destruction est sans aucun doute due à la chaleur, la température d'ébullition du chloroforme étant assez élevée (+ 60°).

Sur le conseil de M. le Professeur JAVILLIER, nous avons également étudié l'action du chloroforme sur l'action synthétisante de l'émulsine en particulier sur la synthèse du β méthylglucoside, réaction prêtant à équilibre. Nous avons constaté que le chloroforme ajouté aux liqueurs ne modifiait ni l'équilibre final (phénomène auquel il fallait s'attendre a priori) ni le temps au bout duquel cet équilibre est atteint. Ce deuxième fait est important au point de vue de l'interprétation du mode d'action du chloroforme. Le fait même que cette substance est sans action *in vitro* nous amène à penser qu'*in vivo* ce n'est pas uniquement sur l'émulsine elle-même qu'agit le chloroforme, mais que cette substance intervient sans doute aussi en modifiant le milieu, ce qui provoque un déplacement de l'équilibre favorable, suivant les conditions, soit à la synthèse, soit à l'hydrolyse.

(1) Le pH du liquide, mesuré colorimétriquement, est identique à celui du témoin (pH = 6,2).

(2) Déjà en 1875 MÜNTZ (cité par FLEURY [98]) avait montré que le chloroforme, qui détruit la vie respectait l'activité diastasique, caractère qui, d'après ce savant, devait permettre de fixer une barrière, combien fragile d'ailleurs, entre la matière vivante et la matière inerte.

Action de l'éther sur l'émulsine.

Nos expériences avec l'éther ont été conduites comme celles avec le chloroforme.

Nous avons préparé, dans les mêmes conditions, un exolysat d'amandes douces non broyées sous l'influence de l'éther. Comme avec le chloroforme, l'exolysat s'est montré plus actif que le témoin.

250 grammes d'amandes broyées et soumises à l'action de l'éther en vapeur saturante pendant 4 heures, puis mises à macérer 24 heures dans 500 cm³ d'eau distillée toluénée nous ont donné 425 cm³ de liquide (au lieu de 375 pour le témoin) ; le précipité obtenu par addition d'alcool (après élimination de la caséine par l'acide acétique) pesait 4 g.,20 (au lieu de 3 g.,50 pour le témoin). L'émulsine ainsi obtenue s'est montrée d'activité semblable à celle de l'émulsine ordinaire.

Comme le chloroforme, l'éther en vapeur saturante n'altère pas l'émulsine. De plus, il ne gêne pas les hydrolyses fermentaires quand on l'ajoute aux liqueurs. A chaud, à la température d'ébullition de l'éther (+ 36°), il n'y a pas destruction totale de l'émulsine. En effet, des amandes broyées épuisées à l'éther au Soxhlet pendant deux heures puis traitées à la manière habituelle, ont donné un rendement ordinaire. Cette émulsine, essayée sur le salicoside, s'est encore montrée active ; elle n'était que légèrement atténuée par rapport au témoin.

Nous avons également étudié l'influence de l'éther sur l'action synthétisante de l'émulsine au cours de la synthèse du méthylglucoside β . Comme dans le cas du chloroforme nous n'avons observé ni modification de l'équilibre final, ni modification de la vitesse de réaction.

Les anesthésiques envisagés (chloroforme et éther) n'ont donc aucune action sur l'activité hydrolysante ou synthétisante de l'émulsine *in vitro*.

Nous allons maintenant étudier dans les mêmes conditions l'influence du formol et de l'acroléine et nous verrons que ces deux substances se comportent différemment.

Action du formol sur l'émulsine.

Le formol est connu comme étant en général un inhibiteur des diastases : pepsine, trypsine, amylase, invertine, émulsine, uréase.

A notre connaissance, les premières expériences concernant l'émulsine sont celles de BOURQUELOT et DANJOU [33] qui, lors d'une étude de l'action des antiseptiques sur l'émulsine, constatèrent que le formol, à la dose de 1 p. 1000, entravait l'hydrolyse du salicoside ; à la dose de 1 p. 100 l'action est beaucoup plus marquée. Nos premières expériences sur l'action du formol sur l'émulsine ont déjà fait, en collaboration avec M. MASCRÉ [153], l'objet d'un mémoire à la Société de Chimie biologique et d'une communication à l'Académie des Sciences. Depuis lors, nous avons approfondi et complété ces expériences.

Nous envisagerons ici l'action du formol au cours de la préparation de l'émulsine, puis son action sur les différentes diastases de l'émulsine au cours de l'hydrolyse ou de la synthèse des principes correspondants, enfin nous discuterons du mode d'action du formol (1).

Nous avons tout d'abord envisagé d'extraire l'émulsine d'amandes formolées :

Un lot de 250 grammes d'amandes, mondées et broyées, est soumis à l'action de vapeur saturante de formol pendant 4 heures. On fait ensuite macérer dans 500 cm³ d'eau distillée pendant 48 heures (2). On passe sur une gaze et on exprime. On recueille une quantité de liquide sensiblement égale à celle du témoin.

On ajoute de l'acide acétique pour précipiter la caséine. Cette précipitation se fait mieux que pour le témoin et la filtration est plus rapide (mais nous verrons qu'en revanche le rendement en émulsine est moindre). On ajoute 3 volumes d'alcool. On laisse déposer 24 heures.

Le précipité, recueilli sur filtre de Büchner, lavé à l'éther et séché dans le vide sulfurique, pèse 2 g.,25 (au lieu de 3 g.,50 pour le témoin). Le rendement est donc diminué. Par contre, l'activité est identique à celle du témoin.

(1) Certaines de ces expériences ont déjà été relatées dans notre article avec M. MASCRÉ. Nous avons cru bon de les rappeler ici afin qu'elles forment un tout homogène avec d'autres expériences inédites.

(2) On n'obtient pas avec l'eau un lait d'amandes comme avec le témoin ; sans doute à cause de l'action coagulante du formol sur la caséine.

PRÉPARATION DE L'ÉMULSINE EN PRÉSENCE DE FORMOL.

Nous avons préparé trois émulsines que nous avons fait agir comparativement sur le saccharose, le lactose, le salicoside et l'amygdalosite. Nous dénommerons ces émulsines : émulsine type, émulsine demi-formolée et émulsine formolée ; expressions arbitrairement choisies comme abréviations commodes pour l'exposé des résultats.

Les techniques de préparation sont les suivantes :

On a séparé les amandes mondées et broyées en trois lots égaux (de 430 grammes chacun, provenant de 500 grammes d'amandes).

Deux de ces lots (soit 860 g.) ont été mis à macérer pendant 48 heures dans deux litres d'eau chloroformée saturée ; par expression à la presse on obtient environ deux litres de liquide laiteux dont on coagule la caséine par addition de 10 cm³ d'acide acétique. Le liquide filtré (1800 cm³) est divisé en deux parties.

L'une d'elles a été additionnée de 100 cm³ d'eau et on l'a versée dans 4 volumes d'alcool à 96°. On a laissé déposer 24 heures, le précipité recueilli a été lavé à l'alcool puis à l'éther et desséché dans le vide sulfurique. On a obtenu finalement 9 g.,30 d'une émulsine type selon la technique de H. HÉRISSEY — et qui servira de terme de comparaison (notons en passant que les amandes employées étaient riches en émulsines ; le rendement étant ici de 18 g. par kg.).

La deuxième fraction de 900 cm³ du liquide précédent a été additionnée de 100 cm³ de formol neutralisé (soit 1/10) et on a ajouté 4 volumes d'alcool à 96°. On a terminé comme précédemment.

Le rendement a été légèrement supérieur (10 g.,50 au lieu de 9 g.,30 (1). Nous appelons cet extrait fermentaire « émulsine demi-formolée » parce que le formol n'intervient que dans la dernière partie de l'opération.

Une troisième fraction de 430 grammes d'amandes a été mise à macérer pendant 48 heures dans 900 cm³ d'eau chloroformée additionnée de 100 cm³ de formol neutralisé (soit 1/10) ; le liquide obtenu par expression est additionné d'acide acétique puis filtré. On termine comme précédemment.

(1) Le précipité obtenu est plus dense, plus facile à obtenir que celui de la préparation type.

Nous avons obtenu 10 g.,70 d'une émulsine que nous appelons « émulsine formolée » parce que le formol intervient ici dès le début de la préparation.

Afin de déterminer l'activité des émulsines obtenues, nous les avons fait agir comparativement sur du saccharose, du lactose, du salicoside et de l'amygdaloside.

Saccharose à 2 p. 100 + 1 p. 1.000 émulsine.

Déviation	Initiale	Après 2 jours	Après 5 jours	Après 10 jours	Après 30 jours
Emulsine type	+ 2°34'	+ 2°22'	+ 2°18'	+ 2°18'	+ 2°20'
Emulsine demi-formolée.	+ 2°34'	+ 2°26'	+ 2°20'	+ 2°20'	+ 2°20'
Emulsine formolée	+ 2°34'	+ 2°30'	+ 2°24'	+ 2°26'	+ 2°26'

Lactose à 5 p. 100 + 2 p. 1.000 émulsine.

Déviation	Initiale	Après 2 jours	Après 5 jours	Après 12 jours	Après 30 jours	Après 50 jours
Emulsine type	+ 5°6'	+ 5°20'	+ 5°32'	+ 5°40'	+ 6°8'	— 6°10'
Emulsine « demi-formolée ».....	+ 5°6'	+ 5°10'	+ 5°10'	+ 5,18'	+ 5°30'	+ 6°
Emulsine « formolée »	+ 5°6'	+ 5°8'	+ 5°8'	+ 5°10'	+ 5°12'	+ 5°44'

Salicoside à 1 p. 100 + 0,5 p. 1.000 d'émulsine.

Déviation	Initiale	Après 2 jours	Après 5 jours	Après 10 jours	Après 12 jours
Emulsine type	— 1°14'	+ 11'	+ 30'	+ 32'	+ 32'
Emulsine « semi-formolée »	— 1°14'	— 20'	+ 28'	+ 32'	+ 32'
Emulsine « formolée » ..	— 1°14'	— 40'	+ 12'	+ 22'	+ 30'

Amygdalosite à 1 p. 100 + 0,5 p. 1.000 d'émulsine.

Déviation	Initiale	Après 2 jours	Après 5 jours	Après 10 jours
Emulsine type	— 44'	+ 22'	+ 36'	+ 38'
Emulsine « demi-formolée »,.....	— 44'	+ 10'	+ 36'	+ 38'
Emulsine « formolée »	— 44'	+ 2'	+ 32'	+ 38'

Dans tous les cas, nous avons constaté que l'émulsine « formolée » était moins active que l'émulsine demi-formolée, qui est elle-même moins active que l'émulsine type (1).

Les différentes diastases de l'émulsine ont toutes subi un affaiblissement incontestable, mais elles ne sont pas détruites, pas même la lactase réputée plus fragile que les autres.

Action du formol sur l'action hydrolysante et synthétisante de l'émulsine.

Nous avons fait agir le formol (solution officinale à 32,5 p. 100) aux concentrations de 1, 2, 5 et 10 p. 100 correspondant à 0,32, 0,65 et 3,25 p. 100 d'aldéhyde formique. Pour éviter toute cause d'erreur due aux variations de pH nos solutions de formol (toujours acides par suite de la présence d'acide formique) étaient neutralisées avant l'emploi par contact avec un excès de carbonate de calcium.

L'émulsine employée dans cette première série d'expériences était de l'émulsine type préparée selon la technique de H. HÉRISSEY et dont la valeur temps avait été déterminée par la méthode de HELFERICH [128] (cette valeur variait entre 167 et 171).

Nous avons donc fait agir la même émulsine sur un principe donné, en présence de quantités variables de formol, et nous avons comparé les résultats à ceux d'une expérience témoin réalisée, dans les mêmes conditions, en l'absence de formol.

L'action de l'émulsine n'a pu être évaluée que par les chan-

(1) Nous avons déterminé par rapport au salicoside et suivant la méthode d'HELPERICH, précédemment décrite, les « valeurs-temps » (ou *Zeitwert*) de ces différentes émulsines. Voici les valeurs trouvées : émulsine-type : 167 ; émulsine demi-formolée : 860 ; émulsine formolée : 1.720.

gements de déviation polarimétrique, la présence de formol s'opposant au dosage des sucres réducteurs libérés (nous avons essayé d'éliminer le formol par différents réactifs (ammoniacque, bisulfite, dimédon) mais les résultats n'ont pas été satisfaisants).

I. Hydrolyse d'hétérosides en présence de formol.

EXPÉRIENCES SUR LE SALICOSIDE.

Elles ont été faites à partir d'une solution de salicoside à 2 p. 100 qu'on diluait au demi, soit avec de l'eau distillée, soit avec de l'eau additionnée de quantités variables de formol de façon à obtenir une concentration en formol de 1, 2, 5, et 10 p. 100 (en volume). On a ajouté 1 p. 1000 d'émulsine.

Les flacons sont placés à l'étuve à 35°, agités plusieurs fois par jour et au moment de l'examen, soit filtrés en présence de noir animal, soit déféqué de la façon suivante :

Liqueur d'expérience	20 cm ³
Extrait de Saturne	1 cm ³
Solution de sodium à 10 p. 100.....	1 cm ³

On observe la déviation polarimétrique au tube de 22 cm, ou au tube de 20 cm. (dans ce cas, on fait la correction nécessitée par la dilution des liqueurs).

Salicoside 1 p. 100 + émulsine 1 p. 1000.

Déviation	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 4 jours	Après 1 mois
Témoin.....	— 1°16'	+ 28'	+ 34'	+ 32'	+ 32'
Formol 1 p.100	— 1°16'	+ 26'	+ 34'	+ 32'	+ 32'
Formol 2 —	— 1°14'	+ 2'	+ 2'	+ 16'	+ 14'
Formol 5 —	— 1°16'	— 52'	— 52'	— 50'	— 34'
Formol 10 —	— 1°16'	— 1°2'	— 1°4'	— 1°2'	— 42'

L'action de l'émulsine est presque terminée en 24 heures. Dans ces conditions, 1 p. 100 de formol ne semble pas influencer l'hydrolyse, tout au moins après 24 heures. A partir de 2 p. 100, il y a retard très net qui s'accroît avec la proportion

de formol (1). En comparant ces résultats avec ceux de BOURQUELOT et DANJOU [33] on constate qu'ils sont entièrement concordants.

Il n'y a pas arrêt absolu de l'hydrolyse. Celle-ci se poursuit, mais très lentement. Le formol est donc un inhibiteur ayant une action retardatrice très nette sur l'hydrolyse du salicoside par la salicosidase de l'émulsine. Nous discuterons de son mécanisme ; mais auparavant, nous envisagerons l'action sur l'amygdalase et de l'amygdalinase.

Amygdaloside 1 p. 100 + 1 p. 1.000 d'émulsine.

Déviations	Initiale	Après 1 h. 30	Après 3 heures	Après 5 heures	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 12 jours
Témoin.....	— 48'	+ 44'	+ 48'	+ 48'	+ 44'	+ 44'	+ 44'
Formol 1 p. 100..	— 48'	+ 8'	+ 20'	+ 30'	+ 44'	+ 44'	+ 44'
Formol 2 —	— 44'	+ 0'	+ 10'	+ 12'	+ 40'	+ 40'	+ 44'
Formol 5 —	— 44'	— 16'	— 14'	— 12'	— 10'	— 10'	— 10'
Formol 10 —	— 44'	— 44'	— 40'	— 40'	— 36'	— 32'	— 36'

Il y a retard de l'hydrolyse comme dans le cas du salicoside. L'action est surtout nette à partir de 2 p. 100 de formol.

β Méthylglucoside à 1 p. 100 + 1 p. 1.000 d'émulsine.

Déviations	Initiale	Après 24 heures	Après 7 jours	Après 12 jours	Après 21 jours	Après 2 mois
Témoin.....	— 34'	+ 16'	+ 32'	+ 32'	+ 32'	+ 32'
Formol 1 p. 100	— 34'	— 40'	— 26'	— 26'	— 28'	— 24'
Formol 2 —	— 34'	— 38'	— 34'	— 34'	— 32'	— 32'
Formol 5 —	— 34'	— 36'	— 36'	— 34'	— 32'	— 32'
Formol 10 —	— 34'	— 36'	— 36'	— 34'	— 34'	— 36'

Le retard exercé par le formol est ici beaucoup plus marqué que dans le cas du salicoside ou de l'amygdaloside. Même à

(1) La même expérience recommencée en déterminant les déviations toutes les heures nous a montré, pour des concentrations en formol de 5 et 10 p. 100, un blocage apparent dès la deuxième heure.

la dose de 1 p. 100 le formol inhibe fortement l'alcool-glucidase β . Son action serait donc plus marquée que sur la phénol-glucosidase qui hydrolyse le salicoside.

Nous avons également envisagé l'action du formol sur d'autres ferments de l'émulsine en particulier sur la *lactase* et la *galactosidase* β .

Nous avons fait agir 1 p. 100 d'émulsine sur une solution de lactose à 5 p. 100 en présence de 1, 2, 5 et 10 p. 100 de formol.

Mais au cours des premiers jours nous avons constaté, fait paradoxal, un retour de la déviation vers la gauche, puis, au bout d'une dizaine de jours, on revenait à la déviation initiale. Les observations polarimétriques sont insuffisantes pour juger du phénomène et on ne peut effectuer le dosage des sucres réducteurs en présence de formol. Nous ignorons ce qui a pu se passer. Nous avons refait l'expérience plusieurs fois, les faits observés ont été identiques.

Peut-être s'agit-il d'une action du formol sur le lactose, et même sur les produits de dédoublement avec modification du pouvoir rotatoire. D'ailleurs, l'action du formol sur les sucres a déjà été étudiée par HEIDUSCHKA et ZIRKEL [125] qui obtinrent des combinaisons de formol avec le lactose, le maltose et le saccharose.

ACTION DU FORMOL SUR LA GALACTOSIDASE β .

Il nous a fallu préparer nous-même un galactoside. Le méthylgalactoside β peut être préparé par synthèse biochimique à l'aide de l'émulsine qu'on fait agir sur un mélange d'alcool méthylique et de galactose (BOURQUELOT et HÉRISSEY [39]).

On a préparé le mélange suivant :

Galactose	50 g.
Alcool éthylique à 85°	850 g.
Eau distillée	150 g.

On a ajouté deux grammes d'émulsine. On a laissé deux mois. La déviation étant passée de $+ 5^{\circ}20'$ à $+ 2^{\circ}30'$, nous avons tenté l'extraction du galactoside. Pour cela, on filtre, on évapore à sec sous pression réduite ; on épuise le résidu à plusieurs reprises par l'éther acétique anhydre (250 cm³), bouillant, au réfrigérant à reflux, on filtre et on laisse cristalliser.

Nous avons ainsi obtenu 6 grammes d'éthylgalactoside β .

Ethylgalactoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 d'émulsine type.

Déviation	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 3 jours
Témoin.....	— 4'	+ 24'	+ 24'	+ 24'
Formol 1 p. 100.....	— 4'	+ 0'	+ 4'	+ 10'
Formol 2 —	— 4'	— 2'	+ 0'	+ 2'
Formol 5 —	— 4'	— 4'	— 4'	+ 0'
Formol 10 —	— 4'	— 4'	— 4'	— 4'

En présence de formol, l'hydrolyse est nettement retardée ; le formol est donc aussi un inhibiteur de la β galactosidase, fait déjà constaté par HELFERICH [129].

Récupération de l'émulsine ayant agi en présence de formol.

Puisque les expériences précédentes montrent qu'après un arrêt rapide, en apparence définitif, l'émulsine continue d'agir lentement, on est amené à penser que la glucosidase n'est pas détruite mais seulement inhibée. Nous avons donc récupéré l'émulsine, ayant agi en présence de formol, et nous l'avons fait agir à nouveau sur un hétéroside. Nous avons opéré comparativement avec une émulsine ayant agi en l'absence de formol.

Sur une solution de salicoside à 1 p. 100, nous faisons agir l'émulsine à la dose de 1 p. 100, d'une part en milieu aqueux, d'autre part en présence de 10 p. 100 de formol. Après 4 jours, nous avons séparé l'émulsine par précipitation alcoolique en ajoutant aux liqueurs 4 volumes d'alcool à 96°. Les précipités sont recueillis lavés à l'alcool, puis à l'éther, et desséchés dans le vide sulfurique.

Nous avons alors préparé une solution de salicoside à 1 p. 100 sur laquelle nous avons fait agir, dans la proportion de rée après hydrolyse du salicoside en milieu aqueux, de l'émulsine récupérée après hydrolyse en milieu formolé. Les résultats sont les suivants :

Déviations	Initiale	Après 48 heures	Après 6 jours
Emulsine type	— 1°16'	+ 32'	+ 32'
Emulsine type récupérée	— 1°14'	+ 26'	+ 32'
Emulsine formulée récupérée	— 1°14'	+ 2'	+ 32'

L'émulsine ayant agi en présence de formol a une action moindre que celle de l'émulsine ayant agi en milieu aqueux, mais son activité est encore très satisfaisante. La salicosidase n'est pas détruite ; les modifications qu'elle a subies sont réversibles.

II. — Action du formol sur l'action synthétisante de l'émulsine

SYNTHÈSE DU β MÉTHYLGLUCOSIDE.

On a fait agir l'émulsine à la dose de 0,20 p. 100 sur une solution de glucose à 2 p. 100 dans l'alcool méthylique à 70 p. 100 (en volume).

Déviations	Initiale	Après 15 jours	Après 1 mois
Témoin.	+ 2°12'	+ 10'	— 4'
Formol 1 p. 100.....	+ 2°12'	+ 24'	— 10'
Formol 2 —	+ 2°12'	+ 46'	+ 14'
Formol 5 —	+ 2°12'	+ 1°40'	+ 1°40'
Formol 10 —	+ 2°12'	+ 2°10'	+ 2°14'

Voici une autre expérience effectuée avec de plus fortes concentrations en glucose. Elle a consisté à préparer synthétiquement le β méthylglucoside, d'après la technique de BOURQUELOT et BRIDEL [30], en présence de formol, comparativement à un témoin. On a procédé sur une solution à 20 p. 100 de glucose dans l'alcool méthylique à 70 p. 100, en présence de 2,5 p. 1.000 d'émulsine.

Déviation	Initiale	Après 7 heures	Après 16 jours	Après 40 jours
Témoin.....	+ 20°30'	+ 15°10'	+ 11°30'	+ 7°20'
Formol 2 p. 100.....	+ 20°30'	+ 16°30'	+ 13°20'	+ 9°20'
Formol 5 p. 100.....	+ 20°30'	+ 16°50'	+ 15°10'	+ 12°52'

Nous avons extrait et identifié le β méthylglucoside dans les liqueurs formolées comme dans le témoin.

SYNTHÈSE DU β ÉTHYLGALACTOSIDE.

On ajoute 0,50 p. 100 d'émulsine à une solution de galactose à 2 p. 100 dans l'alcool à 80° en présence de 1, 2, 5, 10 p. 100 de formol (cependant, il faut attendre 48 heures avant d'ajouter l'émulsine, car le formol modifie la déviation polarimétrique qui ne se stabilise qu'au bout de 48 heures).

Déviation	Initiale	Après 5 jours	Après 15 jours	Après 40 jours	Après 2 mois
Témoin.....	+ 2° 2'	+ 1°50'	+ 1°20'	+ 1° 8'	+ 50'
Formol 1 p. 100.	+ 2° 6'	+ 1°54'	+ 1°40'	+ 1°30'	+ 1°20'
Formol 2 p. 100.	+ 2°20'	+ 2°12'	+ 2°10'	+ 1°50'	+ 1°54'
Formol 5 p. 100.	+ 2°20'	+ 2°16'	+ 2°14'	+ 2°10'	+ 2°10'
Formol 10 p. 100	+ 2°40'	+ 2°36'	+ 2°36'	+ 2°38'	+ 2°38'

L'action retardatrice du formol s'est donc également exercée sur l'action synthétisante de la glucosidase β et de la galactosidase β .

Action du formol sur l'émulsine purifiée.

Afin de nous rendre compte de l'influence des substances accessoires lors de l'inhibition par le formol, nous avons repris les expériences sur le salicoside, mais avec une émulsine purifiée préparée suivant la méthode de WILLSTAETTER [200].

Salicoside 1 p. 100 + 1 p. 1.000 d'émulsine WILLSTAETTER.

Déviations	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 4 jours	Après 12 jours
Témoin.....	— 1°16'	+ 44'	+ 42'	+ 40'	+ 40'
Formol 1 p. 100...	— 1°16'	+ 42'	+ 42'	+ 40'	+ 40'
Formol 2 p. 100...	— 1°16'	+ 14'	+ 10'	+ 16'	+ 20'
Formol 5 p. 100...	— 1°16'	+ 14'	+ 10'	+ 16'	+ 20'
Formol 10 p. 100 ..	— 1°16'	— 1°	— 1°	+ 56'	— 58'

Les résultats sont de même ordre que ceux obtenus avec l'émulsine type (préparée par la méthode de HÉRISSEY [131]).

Action du formol sur l'émulsine de graine de Lin.

Les expériences effectuées sur cette émulsine, improprement appelée linase, sont calquées sur celles qui ont été entreprises avec l'émulsine d'amandes.

Amygdaloside à 1 p. 100 + 1 p. 100 linase.

Déviations	Initiale	Après 2 jours	Après 5 jours	Après 10 jours
Témoin.....	— 44'	+ 16'	+ 20'	+ 20'
Formol 1 p. 100.....	— 44'	— 16'	± 0	± 0
Formol 2 p. 100.....	— 44'	— 28'	— 20'	— 20'
Formol 5 p. 100.....	— 44'	— 36'	— 36'	— 34'
Formol 10 p. 100.....	— 44'	— 40'	— 40'	— 40'

Salicoside à 1 p. 100 + 1 p. 100 linase.

Déviations	Initiale	Après 2 jours	Après 5 jours	Après 10 jours
Témoin	— 1°16'	— 10'	+ 8'	+ 20'
Formol 1 p. 100.....	— 1°16'	— 10'	+ 6'	+ 8'
Formol 2 p. 100.....	— 1°16'	— 30'	— 20'	— 16'
Formol 5 p. 100.....	— 1°16'	— 44'	— 42'	— 42'
Formol 10 p. 100.....	— 1°16'	— 1°12'	— 1°12'	— 1°12'

L'action inhibitrice semble moins marquée que dans le cas de l'amygdaloside.

Méthylglucoside β à 1 p. 100 + 1 p. 100 linase.

Déviation	Initiale	Après 2 jours	Après 10 jours	Après 1 mois
Témoin.....	— 34'	30'	10'	— 20'
Formol 1 p. 100.....	— 34'	— 36'	— 38'	— 34'
Formol 2 —	— 34'	— 34'	— 36'	— 34'
Formol 5 —	— 34'	— 34'	— 34'	— 34'
Formol 10 —	— 34'	— 34'	— 34'	— 34'

Le formol exerce toujours une action retardatrice marquée, et les résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'émulsine d'amandes.

L'hydrolyse du méthylglucoside β est beaucoup plus influencée par le formol que ne l'étaient celle de l'amygdaloside et surtout celle du salicoside.

Action du formol sur l'émulsine d'*Aspergillus*.

L'action du formol sur l'activité du liquide fermentaire d'*Aspergillus niger* nous a paru intéressante en raison de ce fait que dans ce cas l'impureté, la gangue, est réduite au minimum.

Salicoside 1 p. 100 + 50 p. 100 de liquide fermentaire d'Aspergillus.

Déviation	Initiale	Après 1 jour	Après 5 jours	Après 10 jours
Témoin.....	— 1°16'	— 10'	+ 8'	— 32'
Formol 1 p. 100.....	— 1°16'	— 30'	+ 2'	— 32'
Formol 2 —	— 1°16'	— 42'	— 20'	— 16'
Formol 5 —	— 1°16'	— 1° 6'	— 1'	— 36'
Formol 10 —	— 1°16'	— 1°16'	— 1°10'	— 1° 8'

*Amygdalosite 1 p. 100 + 50 p. 100 de liquide fermentaire
d'Aspergillus.*

Déviations	Initiale	Après 1 jour	Après 5 jours	Après 10 jours
Témoïn.	— 44'	+ 22'	+ 40'	+ 42'
Formol 1 p. 100	— 44'	+ 20'	+ 44'	+ 42'
Formol 2 —	— 44'	+ 16'	+ 44'	+ 44'
Formol 5 —	— 44'	+ 0'	+ 14'	+ 42'
Formol 10 —	— 44'	— 36'	— 26'	— 24'

Nous n'avons pu, malheureusement, à cause de la présence du formol, déterminer les variations du sucre réducteur et d'acide cyanhydrique et voir l'action sur l'amygdalase et l'amygdalinase de l'*Aspergillus niger*, ferments étudiés en 1913 par M. JAVILLIER et Mme TCHERNOROUTZKY [137]. L'action retardatrice exercée par le formol est comparable à celle observée avec l'émulsine d'amande — elle est néanmoins moins marquée.

**Action du formol sur la maltase et la tréhalase
d'*Aspergillus*.**

Etudiant les poudres fermentaires d'*Aspergillus niger*, nous en avons profité pour examiner l'action du formol sur la maltase et la tréhalase, ferments qu'on trouve en assez forte proportion dans la poudre d'*Aspergillus*.

Au cours de nos expériences, nous nous sommes aperçu qu'il fallait avoir soin de laisser le formol en contact avec les solutions de sucre pendant au moins 48 heures (surtout pour le maltose) de façon que le pouvoir rotatoire se stabilise (nous avons déjà signalé ce fait à propos du lactose et du galactose. L'action du formol semble surtout nette dans le cas des sucres réducteurs).

Tréhalase 1 p. 100 + 0 g.,25 p. 100 de poudre d'Aspergillus niger.

Déviations	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 4 jours	Après 10 jours	Après 1 mois
Témoin.....	+ 3°30'	+ 2°36'	+ 1°46'	+ 1°2'	+ 1°2'	+ 1°2'
Formol 1 p. 100	+ 3°32'	+ 2°34'	+ 1°46'	+ 1°6'	+ 1°2'	+ 1°2'
Formol 2 —	+ 3°30'	+ 2°40'	+ 2'	+ 1°20'	+ 1°2'	+ 1°2'
Formol 5 —	+ 3°32'	+ 2°46'	+ 2°6'	+ 1°22'	+ 1°6'	+ 1°4'
Formol 10 —	+ 3°34'	+ 3°10'	+ 2°46'	+ 2°20'	+ 1°30'	+ 1°6'

Remarquons que l'action du formol sur la tréhalase de l'*Aspergillus* est très peu marquée, même à la concentration de 5 p. 100 ; à la dose de 10 p. 100 la vitesse de l'hydrolyse est encore satisfaisante.

Maltose 2 p. 100 + 0,25 p. 100 de poudre fermentaire d'Aspergillus.

Deviations	Initiale	Après 1 jour	Après 3 jours	Après 10 jours	Après 25 jours	Après 35 jours
Témoin.....	+ 5°6'	+ 5'	+ 4°16'	+ 2°56'	+ 2°20'	+ 1°56'
Formol 1 p. 100	+ 5°10'	+ 4°40'	+ 3°26'	+ 3'	+ 2°43'	+ 2°36'
Formol 2 —	+ 5°14'	+ 4°50'	+ 3°44'	+ 3°14'	+ 2°50'	+ 2°46'
Formol 5 —	+ 5°20'	+ 5°10'	+ 4°36'	+ 3°44'	+ 3°20'	+ 3°4'
Formol 10 —	+ 5°40'	+ 5°32'	+ 5'	+ 4°10'	+ 3°56'	+ 3°34'

La maltase de l'*Aspergillus* semble plus sensible à l'action du formol que la tréhalase.

MODE D'ACTION DU FORMOL.

Sous le nom d'émulsine, on désigne un extrait fermentaire, donc un mélange complexe de substances. Les unes, actives, sont les diastases, constituant au point de vue pondéral une très petite partie de la masse ; les autres, beaucoup plus importantes au point de vue quantité, forment les impuretés, la gangue, le support, des micelles diastasiques. Parmi ces substances, se trouvent, à côté de glucides condensés (arabanes, galactanes) des protides dont nous avons pris soin de vérifier la présence.

Dans nos expériences, il nous est impossible de séparer l'action que le formol exerce directement sur les diastases de

celle qu'il exerce sur le support. On sait, d'ailleurs, qu'une modification de ce dernier peut suffire à modifier le pouvoir diastasique (WILLSTAETTER [199]).

Tout d'abord, il importait de vérifier que le formol agissait uniquement sur l'émulsine, et non pas sur le principe dédoublable, qu'il pourrait transformer en substance non attaquant par le ferment.

Pour cela, nous avons ajouté 10 p. 100 de formol à une solution de salicoside, puis, après plusieurs jours de contact, nous avons ajouté l'émulsine ; l'hydrolyse est alors identique à ce qu'elle est quand on ajoute le formol en même temps que l'émulsine ; il n'y a donc pas action du formol sur l'hétéroside. (Il n'en serait plus de même avec des holosides comme l'amidon, le lactose, le maltose ou des oses comme le glucose, le galactose avec lesquels le formol est capable de former des combinaisons d'ailleurs mal définies).

Nous avons déjà signalé ce fait à propos de l'action de l'émulsine sur le lactose et sur le galactose en solution alcoolique. On constate d'ailleurs sous l'influence du formol (surtout à forte dose) une modification du pouvoir rotatoire et il faut attendre que celui-ci soit stabilisé avant d'ajouter l'émulsine).

Par contre, si l'on met en contact l'émulsine avec une solution de formol à 10 p. 100, au bout de quelques jours, l'émulsine est devenue inactive.

Lors de l'hydrolyse des hétérosides par l'émulsine, c'est donc bien uniquement sur le ferment qu'agit le formol.

Cette action se traduit par une inhibition nette des actions hydrolysante et synthétisante de l'émulsine. Dès la première heure (si l'on met une dose suffisante de formol) l'hydrolyse paraît bloquée — en réalité il y a seulement un ralentissement de la vitesse de réaction et non pas un arrêt brusque.

Puisque le formol est un inhibiteur de l'émulsine, quel en est le mécanisme ?

On sait que l'action d'une substance inhibitrice sur une action diastasique peut être envisagée à deux points de vue : soit relativement au retard d'hydrolyse qu'elle provoque, soit en envisageant le déplacement du point anguleux de la courbe $V = f(t)$ (les variations de la vitesse d'hydrolyse en fonction du temps se composent généralement d'une portion de droite parallèle à l'axe des temps raccordé à une exponentielle décroissante. La position du point anguleux dépend essentiellement du rapport $\frac{\text{substrat}}{\text{ferment}}$ (COLIN et CHAUDUN [76]).

Nous avons donc fait agir une même quantité d'émulsine sur du salicoside en présence de différentes doses de formol, comparativement à un témoin. A des intervalles égaux (15 minutes) nous avons déterminé la déviation polarimétrique afin de nous rendre compte de la vitesse de réaction ; quand celle-ci commence à décroître on détermine par le calcul la quantité de glucoside qui reste en solution.

I. — *Salicoside 2 p. 100 + émulsine 0,40 p. 100.*

Temps en minutes	Déviatiôn	Différence
0	— 2°32'	36'
15	— 1°56'	38'
30	— 1°48'	30'
45	— 48'	18'
60	— 30'	16'
75	— 12'	18'
90	+ 4'	16'

II. *En présence de 1 p. 100 de formol.*

Temps en minutes	Déviatiôn	Différence
0	— 2°32'	
15	— 2°10'	22'
30	— 1°52'	18'
45	— 1°32'	20'
60	— 1°22'	10'
75	— 1° 2'	12'
90	— 50'	12'

III. *En présence de 2 p. 100 de formol.*

Temps en minutes	Déviatiôn	Différence
0	— 2°32'	
15	— 2°18'	14'
30	— 2° 6'	12'
45	— 1°54'	12'
60	— 1°44'	10'
75	— 1°34'	10'
90	— 1°24'	10'

Le formol ralentit nettement la vitesse de réaction (qui devient presque nulle pour 5 p. 100 de formol).

Voyons s'il modifie également le rapport $\frac{\text{glucoside}}{\text{ferment}}$.

Désignons par a le pourcentage de glucoside non hydrolysé lorsque la vitesse commence à décroître et correspondant au point anguleux de la courbe. Nous obtenons les résultats suivants :

Témoin.....	1 g. $>a>0$ g.,82
Formol 1 p. 100.....	1 g.,42 $>a>1$ g.,30
Formol 2 p. 100.....	1 g.,63 $>a>1$ g.,53

a croît avec la concentration en formol, il y a augmentation apparente de la quantité d'enzyme qui entre en jeu.

L'action du formol sur l'émulsine est donc tout à fait comparable à celle exercée sur l'invertine, étudiée tout récemment par Mlle CHAUDUN [65].

Ces faits étant établis, on peut également se demander s'il s'agit d'une action physique ou d'une action chimique.

Nous avons vu qu'après avoir agi en présence de formol, l'émulsine devenue inactive recouvrait son activité par précipitation alcoolique. Cela conduit à envisager qu'on se trouve en présence de modifications réversibles.

Nous avons voulu examiner d'aussi près que possible le mécanisme des phénomènes. Par contact entre l'émulsine, qui renferme des protides, et le formol, il s'établit une réaction de SÖRENSEN avec libération d'acide (donc changement de pH) et formation de combinaisons méthyléniques. Mais y a-t-il aussi formation de « méthylène-ferments ».

On peut supposer, en dehors de cette action chimique sur les principes aminés (inactifs au point de vue diastasique), une action physique du formol sur les ferments eux-mêmes, une adsorption par exemple, ou une floculation du support colloïdal.

En vue d'apporter quelques précisions sur ces phénomènes, nous avons étudié au cours de l'action du formol sur l'émulsine différents facteurs physico-chimiques tels que le pH, la tension superficielle ; nous avons examiné la solution à l'ultra-microscope. Nous avons procédé à l'ultra-filtration fractionnée, enfin, nous avons dosé le formol afin de voir s'il y avait fixation sur l'émulsine et dans quelles proportions.

Une solution de salicoside est additionnée d'émulsine et de

formol : on effectue périodiquement : la formol-titration, la mesure du pH, celle de la déviation polarimétrique, le dosage du formol libre par le dimédon.

La solution est une solution de salicoside à 1 p. 100 renfermant 10 p. 100 de formol (soit 3,25 p. 100 de HCHO). A 500 cm³ de cette solution, on ajoute 5 grammes d'émulsine (proportion élevée pour rendre plus sensibles les mesures diverses) et l'on place à l'étuve. Pour déterminer l'indice de SÖRENSEN, on prélève 40 cm³ de liqueur dont on titre l'acidité par la soude décimale en présence de phénolphtaléine comme indicateur. (Dans le tableau nous indiquons dans la quatrième colonne le nombre de cm³ de soude décimale employés dans chaque titration).

Pour le dosage du formol, la technique est la suivante : On prélève 2 cm³ de liqueur, on dilue à 50 cm³, on opère le dosage sur 10 cm³ de cette dilution qui correspond à 0,4 cm³ de la liqueur d'expérience. On ajoute V gouttes d'acide acétique à 1 p. 100 et 50 cm³ de solution aqueuse de dimédon à 5 p. 1000. Après deux heures de contact à l'étuve à 30°, on filtre, on lave le précipité avec 10 cm³ d'eau distillée. On fait alors passer sur le filtre, en plusieurs fois, 50 cm³ d'alcool à 90° bouillant : les liqueurs alcooliques sont recueillies dans un cristalliseur taré. Après évaporation et dessiccation à l'étuve à 100°, on pèse. Le poids du résidu multiplié par le coefficient 0,1027 donne le poids de HCHO contenu dans la prise d'essai (en milligrammes pour 0 cm³,4). C'est le chiffre qui figure dans la 3^e colonne du tableau.

La détermination du pH a été faite tantôt colorimétriquement tantôt au potentiomètre.

Salicoside 1 p. 100 + émulsine 1 p. 100, (formol 10 p. 100).

I Temps	II Déviation polarimétrique	III HCHO en mg. p. 0 cm ³ ,4 de liqueur	IV NAOH N/10 p. 40 cm ³ de liqueur	V pH
0 heure. . .	— 1°14'	118,8	2,7	5,6
2 heures. . .	— 1°6'	—	3,8	—
5 —	— 1°4'	123,5	4,1	—
8 —	— 1°4'	125	4,6	—
12 —	— 1°4'	124	4,7	5,4
30 —	— 1°4'	—	5	—
48 —	—	—	5	5,4
72 —	— 44'	121	5	5,3

Cette expérience laisserait supposer qu'il n'y a pas eu de formol fixé par l'émulsine et les mêmes résultats ont été constatés à plusieurs reprises.

L'émulsine se comporterait donc vis-à-vis du formol autrement que les toxines récemment étudiées par VELLUZ [193]. Cependant, l'existence de la réaction de SÖRENSEN doit se traduire par une disparition de formol. Mais cette quantité disparue est peut-être ici trop faible pour être constatée par la méthode au dimédon qui n'est pas assez sensible dans ce cas.

La méthode à l'iodomercurate de BOUGAULT et GROS [19], plus sensible, n'est pas directement applicable à cause de la présence de glucose.

Nous avons alors effectué une nouvelle série d'essais avec du formol et de l'émulsine en l'absence de salicoside. Dans ces conditions, nous avons pu utiliser le dosage du formol suivant la technique de Gros [108]. Nous avons opéré comparative-ment avec une solution de peptone.

On a donc préparé :

- a) une solution de formol à 10 p. 100.
- b) une solution de peptone à 10 p. 100 contenant 10 p. 100 de formol ;
- c) une solution d'émulsine à 10 p. 100, contenant 10 p. 100 de formol ;

On a dosé le formol à différents moments dans les trois flacons, d'après la technique suivante (méthode de Gros) :

Dans une fiole d'Erlenmeyer on introduit 5 cm³ de liqueur diluée au dixième et 35 cm³ de solution d'iodomercurate de potassium (1) puis 20 cm³ de lessive de soude pure. Après 15-20 minutes de contact, on acidule avec ClH au demi ajouté par petites portions et en refroidissant. On verse ensuite 20 cm³ de la solution décimale d'iode et l'on agite jusqu'à dissolution complète du précipité. On titre l'excès d'iode par l'hypo-sulfite décimormal.

Soit n cm³ la quantité d'hypo-sulfite employée ; la teneur en HCHO pour 100 cm³ de liqueur est calculée d'après la formule $p = 3 (20-n)$.

(1)	Cl ² Hg	13 g.,55
	IK	36 g.
	Eau dist. q.s. pour.....	500 cm ³

Les résultats obtenus sont les suivants :

HCHO p. 100	Solution de formol	Solution de peptone	Solution d'émulsine
Au départ	3,35	3,35	3,35
Après 48 heures	3,35	2,72	3,08
Après 8 jours	3,35	2,61	2,77

On constate, dans ces conditions, la disparition d'une petite quantité de formol. La méthode de dosage du formol au dimédon, dans ces liqueurs plus riches en ferments que les précédentes, accuse aussi cette perte et donne des chiffres voisins des précédents (aux erreurs d'expériences près).

Ainsi, l'émulsine a fixé une petite quantité de formol ; cette fixation doit être rapportée à la réaction de SÖRENSEN.

D'après les différentes expériences que nous avons faites, la réaction de SÖRENSEN consomme pour 10 grammes d'émulsine 0,40 à 0,50 de formol. Le formol serait donc fixé sous forme de dérivés méthyléniques par les protides du support ; il ne semble pas qu'il y ait en surplus adsorption.

Ces dernières expériences nous ont donc amené à constater les faits suivants :

1° l'addition de formol se traduit par une libération d'acide (réaction de SÖRENSEN) mais la quantité d'acide libérée n'atteint pas immédiatement son maximum (comme dans le cas d'une solution d'albumine ou de peptone). Le maximum n'est atteint qu'au bout de 30 heures dans les conditions décrites précédemment.

2° le pH, qui est de 6,8 avant l'addition de formol, passe immédiatement à 5,6 pour atteindre peu à peu 5,3.

3. En même temps se forment des dérivés méthyléniques des protides du support. Il n'y a pas adsorption surajoutée de formol.

Il nous reste à parler des expériences de *tension superficielle*, d'*ultra-microscopie* et d'*ultra-filtration*, ainsi que de celles effectuées en milieu tamponné.

En effet, pour éliminer toute influence du pH, nous avons effectué l'hydrolyse du salicoside par l'émulsine, en présence de formol, en tamponnant le milieu avec le mélange acide acétique-acétate de soude et en l'amenant à $\text{pH} = 8$. Les résultats ont été identiques à ceux effectués en milieu non tamponné.

D'ailleurs, si l'on ajoute aux liqueurs d'expérience du carbonate de chaux, le formol bloque l'hydrolyse dans les mêmes conditions.

L'action du formol n'est donc pas due à une modification de pH. Nous avons mesuré aussi la tension superficielle avant et après addition de formol, soit par la méthode stalagmométrique, employée par nous pour la détermination de la tension superficielle du plasma ou du sérum (CLERC, PARIS et STERNE [69], soit par la méthode d'arrachement de LECOMTE DU NOÛY [145] ou de GOIFFON [104]. Nous n'avons pas trouvé de variations sensibles sous l'influence du formol.

Plus intéressante se sont révélées nos expériences d'ultramicroscopie, d'ultrafiltration et de dialyse.

Déjà, au point de vue macroscopique, on constate, en ajoutant du formol à une solution d'émulsine, que celle-ci change rapidement d'aspect ; elle se trouble fortement, devient hétérogène, et un précipité blanchâtre, floconneux se dépose à la longue. Si l'on examine à l'ultramicroscope (nous nous sommes servi de l'appareil cardioïde de ZEISS) on voit sous l'influence du formol la formation de flocons plus ou moins volumineux, perdant leur mouvement brownien. Si après action du formol on laisse déposer le précipité et qu'on examine la liqueur surnageante, celle-ci est optiquement vide.

Pour nos expériences, nous nous sommes servi de l'appareil de DUCLAUX (PROLABO, constructeur) fonctionnant sous pression réduite, et avec les membranes N° 40 (pores de 0,02 micron), N° 600 (pores de 0,07 micron), N° 1.500 (pores de 0,10 micron), N° 3.000 (pores de 0,18 micron).

Ces membranes ont été essayées avec du sérum sanguin dilué au centième et avec une solution d'hémoglobine (on centrifuge 2 cm³ de sang, on lave plusieurs fois à l'eau salée isotonique, finalement on ajoute 200 cm³ d'eau distillée).

La membrane N° 40 ne laissait passer ni l'hémoglobine, ni l'albumine du sérum sanguin ; le N° 600 laisse passer de faibles quantités d'albumine et d'hémoglobine (la solution est à peine colorée, mais bleuit le mélange teinturé de gaiac-eau oxygénée), les N°s 1.500 et 3.000 laissent passer l'hémoglobine et les albumines sériques.

Nous avons soumis des « solutions » d'émulsine à 1 p. 100 à l'ultra-filtration avec ces différentes membranes et nous avons essayé l'activité des ultra-filtrats sur le salicoside. (On dissolvait 1 g. de salicoside dans 50 cm³ de la solution).

Déviations	Au départ	Après 2 heures
<i>Emulsine témoin :</i>		
Solution filtrée sur papier (1)	— 2°32'	+ 36'
<i>Emulsine ultrafiltrée :</i>		
N° 40	— 2°32'	— 2° 6'
N° 600.....	— 2°32'	— 6'
N° 1.500.....	— 2°32'	— 20'
N° 3.000.....	— 2°32'	+ 34'

Seule, la membrane N° 3.000 (pores de 0,18 micron) laisse passer intégralement l'émulsine.

Or, si nous ajoutons 1 p. 100 de formol à une macération d'émulsine (ce qui ne suffit pas pour annihiler son action sur le salicoside) et que nous soumettions à l'ultrafiltre N° 3.000 (qui laisse passer l'émulsine ordinaire), l'ultra-filtrat est peu actif sur le salicoside à 1 p. 100.

Déviations	Au départ	Après 2 heures
Emulsine ordinaire ultrafiltrée	— 1°16'	+ 20'
Emulsine formolée 1 p. 100 ultrafiltrée..	— 1°16'	— 34'

Cette expérience est en faveur d'une agglomération sous l'influence du formol des micelles diastases qui seraient alors retenues par l'ultrafiltration.

Enfin nous signalerons qu'un macéré d'émulsine devenu inactif par contact pendant deux jours avec 5 p. 100 de formol recouvre une grande partie de son activité par dialyse ; le formol n'agirait donc que par sa présence.

CONCLUSIONS.

A la lumière de ces différentes expériences, il nous est permis maintenant d'expliquer l'action du formol.

1. Le formol diminue la vitesse d'hydrolyse des hétérosides tributaires de l'émulsine, et d'autant plus que sa concentration est plus élevée. Nous avons montré dans le cas du salicoside qu'il y avait en même temps « augmentation apparente » de la dose d'émulsine qui entre en jeu.

(1) On sait que les pores des papiers filtres varient de 1 à 5 microns.

2. Cette action retardatrice du formol se retrouve avec des émulsines purifiées et quelle que soit l'origine de l'émulsine (amandes, graines de lin, *Aspergillus niger*). Cependant, son action semble moins marquée sur l'émulsine d'*Aspergillus*.

3. Le formol n'inhibe pas de façon égale toutes les diastases de l'émulsine (1). En particulier l'hydrolyse du méthylglucoside β , toutes choses égales d'ailleurs, est beaucoup plus retardée que celle du salicoside. Peut-être pourrait-on voir là une action plus marquée sur l'alcoolglucosidase que sur la phénolglucosidase.

Le formol pourrait donc servir à séparer certaines diastases de l'émulsine (2) (méthode de destruction partielle).

4. Dans certains cas, plus particulièrement dans celui des sucres réducteurs, le formol n'agit pas uniquement sur le ferment, mais aussi sur la substance hydrolysable dont il modifie le pouvoir rotatoire (3).

5. Il semble bien que l'action inhibitrice du formol sur l'émulsine soit due à une modification physique. En effet, cette réaction est réversible (l'émulsine recouvre partiellement son activité par dialyse ou par précipitation alcoolique).

Elle n'est pas due à une modification de pH.

Il semble, d'après des expériences d'ultrafiltration, d'après l'aspect à l'ultra-microscope, qu'il y ait agglomération des micelles diastasiques. La diminution de surface qui en résulterait pourrait expliquer la diminution d'activité observée.

Cette action physique du formol sur l'émulsine semblerait donc consister en une modification de l'état colloïdal (floculation). Elle s'accorde avec les faits observés de formol-gélification de certains sérums, avec les modifications que la présence de formol apporte aux conditions de précipitation des protides sériques (MASCARÉ et HERBAIN [152]), et des protides du lait (MASCARÉ et BOUCHARA [151]).

(1) Salicosidase, amygdalosidase, galactosidase β , glucosidase β . Signalons également que l'action exercée sur la maltase de l'*Aspergillus niger* est plus marquée que l'action sur la tréhalase.

(2) L'action du formol serait à rapprocher à ce point de vue de celle de l'alcool méthylique qui détruit la sucrase de l'émulsine, ou de l'acide acétique qui détruit la lactase.

(3) Ce qui peut être une cause d'erreur dans l'appréciation de l'hydrolyse.

IV. Action de l'acroléine sur l'émulsine *in vitro*.

Cette étude de l'acroléine est beaucoup moins approfondie que celle du formol, et ceci pour deux raisons : l'acroléine ou aldéhyde acrylique est doué de propriétés lacrymogènes et même suffocantes bien connues, et sa manipulation en est rendue par là même très difficile, surtout quand il faut faire des examens polarimétriques avec des solutions contenant de l'acroléine.

Un autre ennui, dans les expériences conduites avec l'acroléine est que cette dernière, même stabilisée par l'hydroquinone, se polymérise très facilement en solution aqueuse (1) ce qui est gênant pour des expériences de longue durée. On ne sait pas quelle est la quantité d'acroléine non altérée qui se trouve en solution.

Nous avons donc limité nos expériences. Nous avons fait intervenir l'acroléine au cours de la préparation de l'émulsine et ensuite au cours de l'hydrolyse du salicoside.

Nous verrons d'ailleurs que son action se rapproche beaucoup de celle du formol et que le mécanisme est vraisemblablement le même.

On a fait agir l'acroléine en vapeur saturante sur des amandes broyées, avant de les faire macérer dans l'eau distillée ; l'émulsine ainsi obtenue était fortement atténuée.

Voici le détail d'une expérience :

250 grammes d'amandes sont plongés une minute dans l'eau bouillante afin de pouvoir enlever leur tégument ; les 225 grammes d'amandes mondées sont broyées au hachoir universel, puis soumis dans une cloche aux vapeurs saturantes d'acroléine pendant 4 heures. On fait ensuite macérer dans 500 cm³ d'eau distillée (à noter ici que, contrairement à ce qui a lieu avec le témoin, on n'obtient pas de lait d'amandes avec de l'eau, vraisemblablement parce que l'acroléine a coagulé l'agent émulsionnant : la caséine). On exprime et on précipite par 4 volumes d'alcool à 95° : le rendement est inférieur à celui du témoin ; de plus, l'activité est fortement diminuée ainsi que le montre l'essai sur le salicoside à 1 p. 100.

(1) Il y a en particulier formation de disacryle, polymère solide donnant un précipité blanc.

Déviations	Initiale	Après 1 jour	Après 5 jours	Après 10 jours	Après 20 jours
Emulsine témoin 0,20 p. 100.....	— 1°16'	+ 32'	+ 34'	+ 36'	+ 36'
Emulsine acroléinée 0,20 p. 100.....	— 1°16'	+ 56'	— 6'	+ 14'	+ 32'

Le formol employé dans les mêmes conditions n'avait pas atténué l'émulsine ; l'acroléine s'est donc montrée toxique.

Cette expérience est en accord avec ce qui se passe *in vivo*. Là aussi, l'acroléine était plus nocive que le formol ; les poudres fermentaires extraites après action de l'acroléine étaient moins actives que les poudres témoins.

ACTION DE L'ACROLÉINE SUR L'ACTION HYDROLYSANTE DE L'ÉMULSINE.

Voici les résultats obtenus avec une solution à 1 p. 100 de salicoside avec 0,10 p. 100 d'émulsine :

Déviations	Initiale	Après 1 jour	Après 10 jours
Témoin.....	— 1°16'	+ 42'	+ 42'
Acroléine 1 p. 100.....	— 1°16'	+ 6'	+ 20'
Acroléine 2 —	— 1°16'	— 22'	— 4'
Acroléine 5 —	— 1°16'	— 1° 6'	— 24'
Acroléine 10 —	— 1°16'	— 1°16'	— 1°16'

L'action inhibitrice de l'acroléine est donc plus marquée, toutes choses égales d'ailleurs, que celle du formol.

Nous avons diminué la concentration en acroléine afin de voir si même à la dose de 1. p. 1000 il y aurait inhibition.

Déviations	Initiale	Après 4 heures	Après 24 heures	Après 48 heures
Témoin.....	— 1°14'	+ 36'	+ 36'	+ 38'
Acroléine 1 p. 1000.....	— 1°14'	— 16'	+ 20'	+ 34'

L'acroléine même à très faible dose, a déjà une action retardatrice marquée.

Quant à son mode d'action, il nous semble identique à celui du formol. En effet, l'émulsine demeure inactive par contact avec l'acroléine, mais recouvre son activité par précipitation alcoolique ou par dialyse. Le phénomène est donc réversible. Comme le formol, l'acroléine ajoutée à des solutions d'émulsine y produit une sorte de floculation. Tous ces faits sont en faveur d'une action physique de l'acroléine.

La question de dose mise à part, l'acroléine semble donc devoir être placée dans la même catégorie que le formol au point de vue de son action sur l'émulsine : c'est un inhibiteur, agissant déjà à très faible dose et dont le mode d'action est vraisemblablement d'ordre physique.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

Rapport entre les modifications chimiques et les modifications d'ordre cytologique.

Lors de nos expériences, nous avons vu qu'*in vivo* le *chloroforme* et l'*éther* étaient des accélérateurs de l'action de l'émulsine (tant au point de vue synthétisant qu'au point de vue hydrolysant) tandis qu'*in vivo* ces mêmes substances étaient sans action. Quant au *formol* et à l'*acroléine*, ce sont des inhibiteurs de l'émulsine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (à condition toutefois d'employer des doses suffisantes, car à faible dose, tout au moins *in vivo*, ils peuvent être aussi des stimulants de l'action de l'émulsine). Pour expliquer l'action de ces différents corps organiques, nous croyons qu'il est intéressant de comparer les résultats obtenus au point de vue chimique sous l'influence des substances envisagées (et en particulier des anesthésiques) aux modifications d'ordre cytologique constatées par différents auteurs.

Comme nous l'avons déjà dit, c'est GUIGNARD qui, le premier, étudia le problème du dédoublement diastasique sous l'influence des anesthésiques. Examinant les cellules soumises à l'action des vapeurs de chloroforme, ce savant constata qu'il y avait plasmolyse et par la suite de nombreux auteurs (MIRANDE, HECKEL, MAQUENNE et DEMOUSSY, GUÉRIN et LORMAND) montrèrent que beaucoup de substances volatiles agissent comme le chloroforme, c'est-à-dire provoquent la plasmolyse et le dédoublement diastasique des hétérosides.

C'est cette plasmolyse que GUIGNARD rendit responsable du dédoublement diastasique. En effet, dans des travaux antérieurs, ce savant avait montré que ferment et glucoside se trouvaient dans des cellules différentes, ce qui explique pourquoi il n'y a pas habituellement hydrolyse diastasiques des hétérosides *in vivo*. Dans deux mémoires publiés en 1890, GUIGNARD [114, 115] avait fait connaître la localisation de l'émulsine et des principes cyanogénétiques pour les feuilles de Laurier-cerise et les Amandes amères, ainsi que la localisation de la myrosine et du myronate de potasse chez les Crucifères.

Chez les feuilles de Laurier-cerise l'émulsine avait été identifié microchimiquement à l'aide du réactif de Milon : le fer-

ment se trouvait uniquement dans les cellules de l'endoderme et du périecyle.

Ces faits étant acquis, il est facile, d'après GUIGNARD, d'expliquer l'action du chloroforme : « Sous l'influence des anesthésiques, le contenu cellulaire subit une véritable déshydratation, puisqu'une partie du liquide passe à l'extérieur de la cellule, les glucosides sont entraînés avec l'eau qui les tient en solution et arrivent au contact des ferments localisés dans des cellules spéciales, d'où le dédoublement avec production d'essence ou d'acide cyanhydrique ».

A la lumière des travaux sur l'action des anesthésiques sur la structure de la cellule végétale (dont les plus récents sont ceux de M. MASCRÉ et PICARD [154] et d'après les résultats obtenus lors de notre étude de l'émulsine *in vitro* et *in vivo*, le mécanisme d'action du chloroforme et de l'éther nous paraît plus complexe. Si la plasmolyse reste un fait incontestable, il y a peut être d'autres phénomènes qui entrent en jeu.

Mais, avant de discuter de l'importance de la plasmolyse, peut-on admettre sans réserve que l'émulsine et les hétérosides qu'elle dédouble sont dans des cellules différentes.

La localisation de l'émulsine ne peut être résolue que par une étude micrographique, mais, comme le fait remarquer GUIGNARD lui-même, cette localisation est difficile, car on ne connaît ni la constitution, ni de réactif spécifique de l'émulsine : le réactif de MILON est un réactif des albumines.

S'il reste exact que chez le Laurier-cerise il y a des cellules nettement localisées, se colorant en rose sous l'influence de ce réactif et contenant de l'émulsine accompagnée d'albumine, n'existerait-il pas d'autres cellules contenant également de l'émulsine, mais en quantité moindre et ne se colorant pas par le réactif de MILON ?

Cette hypothèse n'est pas à rejeter à première vue ; GUIGNARD, au cours de ses remarquables travaux sur la localisation des principes actifs des Crucifères, Caparidacées, Tropéolées, reconnaît que certaines plantes (*Tropaeolum*, *Limnanthes*) ne présentent pas ou presque pas de cellules à ferment colorables par le réactif de MILON et cependant sont capables de décomposer le myronate de potasse (sinigroside). Il en donne l'explication suivante :

« L'exemple de la Capucine montre d'ailleurs que ce dernier (le ferment) peut être disséminé dans le parenchyme foliaire en proportion trop faible à l'intérieur des cellules pour qu'on

puisse le mettre en évidence à l'aide des réactifs microchimiques » [115].

ROSENTHALER [184] s'est occupé également de la localisation de l'émulsine et de l'hétéroside cyanogénétique chez les feuilles de Laurier-cerise. Cet auteur utilise comme test microchimique la décoloration, sous l'influence de HCN, des grains d'amidon légèrement colorés par l'iode. Pour la localisation de l'hétéroside il fait agir une solution d'émulsine, en présence de glycérine pour éviter la diffusion.

Par cette méthode, ROSENTHALER a trouvé de la prulaurasine dans les parenchymes et les tissus conducteurs, et de l'émulsine dans les mêmes cellules. A la lumière de ces expériences, et aussi d'après les résultats (en particulier les phénomènes de synthèse) que nous avons obtenus avec l'émulsine *in vivo* sous l'influence du chloroforme et de l'éther il nous apparaît comme vraisemblable que ferment et glucoside existent dans une même cellule, le ferment étant sous forme de complexe (nous reviendrons d'ailleurs sur la nature de ce complexe) au niveau du protoplasme, tandis que l'hétéroside serait en solution dans le suc vacuolaire.

Cette hypothèse nous paraît en accord avec les faits observés. En effet, à l'aide de techniques microscopiques, on a pu dans certains cas, localiser des hétérosides au niveau des vacuoles [120], d'autre part CHIBNALL [67], se basant sur des phénomènes d'exolyse, a indiqué une méthode permettant de séparer le suc vacuolaire du cytoplasme — or, ces exolysats, provenant du vacuome, contiennent entre autres substances des glucides mais non des diastases.

Enfin, nous rappellerons que, dans certains cas, on a pu localiser les diastases soit dans l'hydrogel cytoplasmique, soit au niveau des plastes ou des mitochondries (ou chondriosomes) [78]. Nous rapprocherons de ces travaux ceux de COWDRY [80] et ceux de PARAT [169] sur le fonctionnement du chondriome ; ces auteurs assimilent les mitochondries à des diastases, et, d'après ces savants, l'interface chondriome-vacuole représente un système d'activité considérable.

Voyons maintenant la question de l'*exolyse* et de la *plasmolyse*. Sous l'influence des vapeurs de chloroforme et d'éther nous n'avons pas toujours pu constater une *exolyse* et les lots pesés au sortir de la cloche n'avaient en général pas diminué de poids (1). Cela peut tenir à ce que l'eau est bien sortie des cel-

(1) Des constatations analogues viennent d'être faites par QUETEL [179].

lules, mais elle est restée dans les méats intercellulaires sans apparaître à l'extérieur : il y a eu *exolyse cellulaire sans exolyse tissulaire*, et dans ce cas on peut se demander si l'exolyse a pu pénétrer dans toutes les cellules.

Quant à la plasmolyse provoquée par le chloroforme et l'éther, si elle coïncide avec un dédoublement des hétérosides, elle ne nous paraît pas suffisante pour expliquer les différents phénomènes observés. Nous ferons remarquer ici que la plasmolyse provoquée par des solutions hypertoniques (sulfate de soude, saccharose) ne donne pas lieu à l'hydrolyse diastatique. (Des feuilles d'*Aucuba* plongées dans des solutions de chlorure de sodium, de sulfate de sodium à 20 p. 100, n'ont pas noirci, même après 24 heures de contact). On a aussi invoqué comme mécanisme d'action l'*abaissement de la tension superficielle* provoquée par le chloroforme ou l'éther [168]. Or, s'il en était ainsi, tous les agents tensio-négatifs devraient produire les mêmes phénomènes que le chloroforme ou l'éther sur les tissus végétaux.

Nous avons essayé divers agents tensio-négatifs (et en particulier l'alcool octylique primaire qui, comme nous l'avons montré [69] est capable d'abaisser fortement la tension superficielle de l'eau, même à très faible dose) sur l'émulsine et nous n'avons constaté aucune variation appréciable. Donc s'il est vrai que le chloroforme et l'éther sont des agents tensio-négatifs (d'ailleurs assez faibles) il semble bien que ce n'est pas uniquement à cette propriété qu'ils doivent leur action sur l'émulsine *in vivo*.

ARMSTRONG [1], qui étudia également le mécanisme d'action des anesthésiques sur les tissus végétaux, fait jouer à ces corps le rôle de véritables hormones traversant les membranes et conditionnant le passage de l'eau. Cette modification du degré d'hydrophilie de la cellule, sous l'influence de l'éther et du chloroforme, nous paraît très importante. Elle peut être rendue responsable de la dissociation de certains complexes et pourrait expliquer la mise en liberté de ce ferment.

Cette question de dissociation de complexes nous amène à comparer l'action qu'exercent *in vivo* les vapeurs de chloroforme ou d'éther sur les hétérosides tributaires de l'émulsine aux modifications observées au point de vue cytologique. Le chloroforme et l'éther qui, comme nous venons de le voir, se comportent de la même manière au point de vue des variations des hétérosides tributaires de l'émulsine, ont également une action

cytologique analogue, l'action du chloroforme étant plus rapide que celle de l'éther.

Depuis les expériences de GUIGNARD, l'action des anesthésiques sur la structure de la cellule végétale a été étudiée par de nombreux auteurs (BEAUVÉRIE, CORNET, HOCQUETTE et Mlle VILLARD, NADSON [162] etc...), mais les recherches les plus récentes dans ce domaine sont celle de MASCRÉ et PICARD [154] (sur la racine d'*Allium*) et de PICARD [174] sur d'autres végétaux (en particulier sur les feuilles d'*Aucuba japonica*). MASCRÉ et PICARD observent les faits suivants : « Sous l'influence des vapeurs d'éther ou de chloroforme il y a très rapidement plasmolyse du cytoplasme, puis bouleversement des vacuoles et enfin transformation en « boules sarcodiques ». C'est après l'établissement de la plasmolyse qu'apparaissent les modifications du chondriome — en même temps, par suite de lipophanérose, il apparaît dans la cellule des inclusions grasses ; ces altérations démontrent le dédoublement des complexes lipido-protidiques du cytoplasme et du chondriome. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par une action déshydratante des vapeurs anesthésiques et par leur affinité par les lipides auxquels les anesthésiques sont miscibles ».

Notons que les transformations sont jusqu'à un certain point réversibles ; lorsque l'altération du cytoplasme ne va pas jusqu'à la transformation en « boules sarcodiques » il y a retour à l'intégrité après élimination de l'anesthésique. On peut donc distinguer deux phases dans les modifications protoplasmiques l'une réversible (pour de faibles doses d'anesthésique, dose d'ailleurs variable suivant la sensibilité de l'organe et du végétal envisagé), l'autre irréversible.

Ces considérations nous paraissent intéressantes en vue de l'explication des phénomènes observés au point de vue chimique sous l'influence des vapeurs de chloroforme et d'éther.

En effet, le fait que ces substances anesthésiques sont sans action sur l'émulsine *in vitro* et au contraire très actives *in vivo*, ainsi que la légère activation des produits fermentaires obtenus après action de ces substances, nous amène à supposer que ce ferment existe, *in vivo*, sous forme de complexe, peut être de nature lipidoprotidique, dissociable sous l'influence des anesthésiques (le fait que dans certaines conditions la pancréatine est capable de libérer tout au moins partiellement, l'émulsine donne quelque vraisemblance à cette hypothèse).

En conséquence, on peut supposer que le chloroforme et l'éther, modifiant le degré d'hydrophilie du protoplasme, dis-

socient le complexe diastasique et libèrent par là même l'émulsine ; d'autre part, la plasmolyse (due dans le cas des anesthésiques à une modification de la perméabilité de la membrane) et le bouleversement protoplasmique amèneraient en contact les hétérosides provenant du vacuome avec l'émulsine « libérée ».

Cette hypothèse, en accord avec les faits observés au point de vue cytologique et les résultats obtenus au point de vue chimique, semble bien rendre compte des phénomènes d'hydrolyse, mais comment peut-on interpréter les phénomènes de synthèse constatés dans certains cas au début de l'action des vapeurs anesthésiques ?

Il faut remarquer que la destruction des complexes (dont le chondriome est morphologiquement le type) n'est pas immédiate et on peut admettre que la période de prédominance de l'action synthétisante correspond à cette période de latence (ou première phase, réversible, de l'action des anesthésiques) précédant la destruction des complexes lipido-protidiques et l'action irréversible sur le cytoplasme. Au cours de cette phase il faut également envisager les modifications de milieu provoquées par les substances volatiles envisagées. Or on sait, en particulier depuis les expériences de BOURQUELOT et de ses élèves, qu'en modifiant les conditions du milieu il peut y avoir modification de l'équilibre des réactions diastases. Les modifications apportées au milieu (en particulier la concentration provoquée par la plasmolyse) peuvent favoriser l'action synthétisante de l'émulsine. Donc, à côté d'une action directe sur les complexes diastases, viendrait s'ajouter une action indirecte sur la composition de la matière vivante. Evidemment nous n'ignorons pas toute la part d'hypothèse qu'il y a dans cette conception de l'action du chloroforme et de l'éther sur l'émulsine *in vivo*. Néanmoins nous avons cru bon de l'exposer, car, à notre avis, elle permet d'expliquer les phénomènes observés.

En ce qui concerne le formol et l'acroléine leur action cytologique est moins bien connue (nous nous proposons d'ailleurs de reprendre cette étude) ; cependant, d'après les faits constatés au point de vue chimique, nous croyons qu'*in vivo* et à faible dose le mécanisme d'action serait analogue à celui du chloroforme et de l'éther. Quant à l'inhibition constatée *in vivo* avec de fortes doses elle nous paraît relever du même mécanisme que l'inhibition constatée *in vitro*,

CONCLUSIONS.

Les résultats obtenus au cours de nos expériences sur l'émulsine *in vivo* et *in vitro* nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

Parmi les quatre substances organiques volatiles étudiées nous pouvons distinguer deux catégories : d'une part le *chloroforme* et *l'éther*, qui sont des accélérateurs de l'action de l'émulsine *in vivo*, mais sont sans action *in vitro* ; d'autre part *le formol* et *l'acroléine* qui sont des inhibiteurs de l'action de l'émulsine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (à condition toutefois d'employer des doses suffisantes).

In vivo, les résultats obtenus avec les feuilles d'*Aucuba* et de Laurier-cerise étant différents nous les exposerons séparément.

Chez les feuilles d'*Aucuba*, les vapeurs de chloroforme et d'éther provoquent : à forte dose, en quelques heures, une hydrolyse totale de l'hétéroside, l'action du chloroforme étant plus rapide que celle de l'éther ; à faible dose, il faut prolonger la durée d'action pour arriver au même résultat.

Les produits fermentaires obtenus après action des anesthésiques se sont montrés plus actifs que les témoins.

Quant aux vapeurs de formol et d'acroléine, elles ont donné des résultats différents suivant la dose employée : à forte dose, il n'y a pas eu hydrolyse de l'hétéroside (ou tout au moins celle-ci était très faible et n'augmentait pas avec la durée de l'expérience) ; par contre à faible dose, il y a hydrolyse d'autant plus marquée que l'action est plus prolongée.

Les produits fermentaires sont moins actifs que les témoins, surtout après action de fortes doses de formol ou d'acroléine.

Chez les feuilles de Laurier-cerise, nous avons constaté sous l'influence des vapeurs de chloroforme et d'éther et pour des expériences de courte durée, une augmentation de l'acide cyanhydrique et, à l'aide de la méthode biochimique, une augmentation d'hétéroside dédoublable par l'émulsine. Il y aurait donc dans ces conditions *synthèse in vivo*. Si l'on prolonge la durée d'action des vapeurs anesthésiques, on constate une diminution de l'hétéroside cyanogénétique.

Les produits fermentaires sont en général plus actifs que les témoins.

Les vapeurs de formol et d'acroléine, aussi bien à fortes doses qu'à faibles doses, ne provoquent guère de variations d'hé-

téroside. Tout au plus, dans certains cas, peut-on constater une légère hydrolyse.

Les produits fermentaires correspondants sont moins actifs que les témoins.

In vitro, nous avons constaté qu'au cours de la préparation de l'émulsine, le chloroforme et l'éther, agissant sur les amandes non broyées, étaient capables de donner des liquides fermentaires plus actifs que les témoins. Par contre ces substances sont sans influence (tant sur la vitesse de réaction que sur l'état d'équilibre) sur l'activité hydrolysante ou synthétisante de l'émulsine quelle que soit son origine (amandes, graines de lin, *Aspergillus*) ou son degré de pureté.

Il n'en est pas de même du formol et de l'acroléine qui se sont montrés des inhibiteurs de l'émulsine *in vitro*. L'étude de l'action du formol a particulièrement retenu notre attention. Nous avons montré que cette action inhibitrice était plus ou moins marquée sur les différents ferments de l'émulsine (salicidase, glucosidase β , amygdalosidase, galactosidase β) ; elle porte à la fois sur la vitesse de réaction, qui est diminuée, et sur la « quantité apparente » de ferment qui est augmentée. Quant au mécanisme d'action, certaines de nos expériences (récupération de l'émulsine, aspect à l'ultramicroscope, dialyse, ultrafiltration) sont en faveur d'une action plutôt physique que chimique (et il en est vraisemblablement de même pour l'acroléine).

Les résultats obtenus au point de vue chimique, comparés aux phénomènes constatés au point de vue cytologique, sous l'influence des mêmes substances (en particulier des anesthésiques) par différents auteurs nous ont amené à envisager que l'émulsine existerait *in vivo*, tout au moins partiellement, sous forme de complexe (qui serait localisé au niveau du chondriome ou des plastes), dont la nature chimique nous est encore inconnue (peut être lipido-protidique), et qui serait dissocié par les vapeurs anesthésiques.

Quant à la plasmolyse, insuffisante en elle-même pour expliquer tous les faits observés, elle aurait pour effet de mettre en contact le ferment « libéré » avec l'hétéroside provenant du vacuome. Enfin, il nous semble qu'il faille envisager en outre une action des substances envisagées sur la composition du milieu, le changement des conditions de milieu favorisant l'action de l'émulsine soit dans le sens synthétisant, soit dans le sens hydrolysant. Cette conception du mode d'action de l'éther

et du chloroforme, d'ailleurs en accord avec les faits d'ordre chimique et aussi d'ordre cytologique, permet d'expliquer non seulement l'hydrolyse, mais aussi la synthèse *in vivo* d'hétérosides tributaires de l'émulsine constatée dans certains cas et dans certaines conditions sous l'influence de vapeurs anesthésiques. Quant au formol et à l'acroléine, à faible dose, leur mode d'action se rapprocherait de celui du chloroforme ou de l'éther, tandis qu'à forte dose l'inhibition constatée *in vivo* serait de même nature que celle qui est obtenue *in vitro*

DEUXIÈME PARTIE.

Etude de la rhamnodiastase.

Nous avons déjà vu que BRIDEL et CHARAUX [53] ont donné le nom de rhamnodiastase au produit fermentaire, extrait des graines de divers *Rhamnus*, et dont ils indiquent un mode de préparation à partir des graines de *Rhamnus utilis*.

Rappelons que la rhamnodiastase hydrolyse plusieurs séries d'hétérosides à glucides complexes (primevérosides, rutinoides, rhamninosides) en laissant intacts les différents glucides (primevérose, rutinose). Bien que relativement peu de travaux aient été effectués à propos de la rhamnodiastase, glucidase de découverte récente, celle-ci semble d'un grand intérêt en physiologie végétale, car, d'après les premiers résultats obtenus, les hétérosides tributaires de la rhamnodiastase paraissent être aussi répandus dans le règne végétal que les glucosides tributaires de l'émulsine.

Comme pour l'émulsine et l'invertine, nous avons donc voulu étudier le comportement de la rhamnodiastase *in vivo* et *in vitro* sous l'influence de différents corps organiques (chloroforme, éther, formol et acroléine).

Comme matériel d'étude, nous nous sommes adressé à la Gaulthérie (contenant un primevéroside) aux graines d'Avignon (contenant un rhamninoside) et enfin à la Rue (contenant un rutinoides) que l'on peut se procurer assez facilement à l'état frais et à différentes époques de la végétation.

Quant aux techniques employées, nous avons eu recours une fois de plus à la méthode biochimique, qui est la plus commode pour suivre les variations des hétérosides, car le dosage de l'aglycone ou l'extraction de l'hétéroside sont trop sujets à des causes d'erreur.

La méthode biochimique à la rhamnodiastase calquée sur celle à l'émulsine de BOURQUELOT [26] a été instituée, en 1926, par BRIDEL et CHARAUX [54].

L'action de la rhamnodiastase, portant à la fois sur des primévrosides, des rutinoides, des rhamninosides, est plus étendue que celle de l'émulsine, qui n'hydrolyse que les glucosides proprement dits. Elle est moins spécifique.

Néanmoins, ces différentes catégories d'hétérosides ne se trouvent pas simultanément chez les végétaux. On peut donc utiliser la rhamnodiastase pour rechercher et même pour doser certains hétérosides.

Cependant, si cette méthode permet de reconnaître chez les végétaux des hétérosides dédoublables par la rhamnodiastase, elle donne des résultats moins nets que la méthode à l'émulsine, au point de vue physiologie végétale, quand on veut étudier les variations des hétérosides.

En effet, parmi les hétérosides tributaires de la rhamnodiastase, comme le font remarquer BRIDEL et CHARAUX [54], les uns sont insolubles dans l'eau, les autres précipitables par l'extrait de Saturne, qui sert à la défécation avant l'examen polarimétrique. Le changement de déviation, produit par l'hydrolyse, ne portera que sur le sucre formé (tandis que dans le cas des hétérosides hydrolysés par l'émulsine il provient à la fois de la formation de sucre réducteur et de la disparition de l'hétéroside.

D'autre part, les holosides mis en liberté par la rhamnodiastase sont complexes (biosides, triosides), moins réducteurs que le glucose, et souvent doués de faible pouvoir rotatoire (comme le rutinoose et le primévrosoose par exemple). A de faibles variations de la déviation polarimétrique ou du pouvoir réducteur, peuvent correspondre des variations assez considérables d'hétérosides.

Ces réserves étant faites, la méthode biochimique à la rhamnodiastase nous a permis de suivre les variations d'hétérosides, tributaires de ce ferment, sous l'influence du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine.

La technique a été sensiblement la même que la méthode biochimique à l'émulsine : la plante est stabilisée à l'alcool bouillant et épuisée à l'alcool une deuxième fois. Les colatures sont évaporées à sec, sous pression réduite. L'extrait est repris par l'eau distillée bouillante, et filtré immédiatement. On amène la liqueur extractive à un volume déterminé. Pour les

plantes fraîches, on s'arrange pour que 100 cm³ correspondent à 100 grammes ; pour les plantes sèches on dilue au demi ou au quart les liqueurs extractives.

La rhamnodiastase (comme d'ailleurs l'émulsine) renfermant de l'invertine, il est nécessaire de faire agir ce ferment au préalable (ce qui permet de doser le saccharose) comme dans le cas de la méthode biochimique à l'émulsine.

A. — Étude de la rhamnodiastase *in vivo*.

Pour étudier l'influence des vapeurs de chloroforme, d'éther, de formol et d'acroléine sur la rhamnodiastase, nous nous sommes adressé à des plantes contenant des hétérosides hydrolysables par ce ferment. Nos expériences ont porté sur des feuilles sèches de Gaultherie, des graines d'Avignon et des feuilles ou des sommités fleuries de Rue à l'état frais.

1° EXPÉRIENCES SUR LES FEUILLES SÈCHES DE GAULTHERIE.

La Gaulthérie (*Gaultheria procumbens* L.) (Ericacées) est un arbrisseau qui croît en abondance dans les régions froides de l'Amérique du Nord et qu'on trouve difficilement à l'état frais dans nos régions. C'est pourquoi nous n'avons pu employer que des feuilles sèches.

Elles contiennent un hétéroside à salicylate de méthyle dédoublable par la rhamnodiastase et identique au monotropitoside (BRIDEL et Mlle GRILLON [57]). Ce monotropitoside, isolé en 1923 du *Monotropa Hypopitys* L. par BRIDEL [47] fut retrouvé par ce même savant dans diverses espèces de Spirées [49] ; il donne par hydrolyse diastasique du primevère (1) (ou xyloglucose) et du salicylate de méthyle.

Nous avons fait agir le chloroforme en vapeur saturante pendant deux heures et en atmosphère humide. En effet, le chloroforme ne provoque aucun dégagement de salicylate de méthyle avec les feuilles sèches. Nous avons donc disposé dans la cloche un petit cristalliseur contenant de l'eau.

Comme d'ordinaire, nous avons procédé sur 100 grammes de feuilles. On stabilise en projetant les feuilles entières dans un litre d'alcool à 80° bouillant ; on décante ; on broie le résidu

(1) Ce bioside fut isolé pour la première fois par GORIS, MASCRÉ et VISCHNIAC [106 a] par hydrolyse fermentaire des glucosides de la Primevère.

au hachoir universel ; on épuise de nouveau avec 500 cm³ d'alcool. On maintient à l'ébullition pendant une demi-heure. On filtre ; on distille à sec sous pression réduite sans dépasser + 50° ; le résidu est dissous dans de l'eau chaude.

Cette liqueur extractive ne peut pas servir à faire directement un essai biochimique à la rhamnodiastase, tel que l'ont indiqué BRIDEL et CHARAUX [54]. Cela tient à la présence, chez la Gaulthérie, d'une grande quantité de tanin, qui précipite le ferment et ralentit son action (Mme S. RABATÉ [180]). Le même fait avait déjà été remarqué, pour l'émulsine, par Mlle FICHTENHOLZ [96], en 1911, dans la recherche de l'arbutoside chez la Busserole, plante de la même famille que la Gaulthérie (Ericacées). Il faut donc déféquer en ajoutant 20 cm³ d'extrait de Saturne ; on filtre au Büchner ; on lave le précipité et on élimine l'excès de plomb du filtrat par l'hydrogène sulfuré. On filtre de nouveau et on distille à sec sous pression réduite. Ce résidu est dissous dans de l'eau distillée de façon à obtenir une solution dont 100 cm³ correspondent à 100 grammes de feuilles sèches. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XVI. — *Action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine en vapeur saturante sur les feuilles sèches de Gaulthérie.*

	Témoin	CHCl ₃ 2 heures	Ether 2 heures	Formol 2 heures	Acroléine 2 heures
<i>Déviations :</i>					
Avant rhamnodiastase...	— 2°28'	— 2°34'	— 2°32'	— 2°26'	— 2°28'
Après rhamnodiastase...	— 2°52'	— 2°50'	— 2°50'	— 2°52'	— 2°54'
<i>Sucre réducteur :</i>					
Avant rhamnodiastase...	7,595	7,283	7,576	7,603	7,640
Après rhamnodiastase...	7,863	7,442	7,782	7,863	7,912
<i>Action de la rhamnodiastase :</i>					
Retour de la déviation...	24'	16'	18'	26'	26'
Sucre réducteur formé...	268	159	206	260	272

Il y a donc eu hydrolyse du monotropitoside sous l'influence du chloroforme (diminution de 40 p. 100) et de l'éther (diminu-

tion de 23 p. 100) et pas de changement avec le formol et l'acroléine.

Cependant, notons que la quantité d'hétéroside est très petite - d'après la quantité de sucre réducteur formé sous l'influence de la rhamnodiastase, elle est de l'ordre de 5 grammes par kilogramme ; la dessiccation a provoqué la destruction d'une très forte proportion d'hétéroside. Le fait a déjà été signalé par PROCTER [178] et, plus récemment, par BRIDEL et Mlle GRILLON [58].

Ces expériences seraient à reprendre sur la Gaulthérie fraîche.

Nous avons préparé un extrait et une poudre fermentaires à partir des feuilles de Gaulthérie sèche, et après action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine en vapeur saturante et en atmosphère saturée de vapeur d'eau.

Nous avons employé des techniques analogues à celles proposées par Mme S. RABATÉ [180].

200 grammes de feuilles sèches de Gaulthérie sont réduites en poudre demi-fine à l'aide d'un hachoir universel, puis du moulin à café. On lixivie rapidement (en 4 heures) par 1.200 cm³ d'alcool à 60° ; le marc est ensuite lavé à l'éther. On a ainsi une poudre fermentaire lavée à l'alcool-éther.

Nous avons préparé une poudre fermentaire témoin et des poudres fermentaires chloroformée, éthérée, formolée, acroléinée après 4 heures d'action de la substance envisagée.

Quant aux extraits, ils ont été obtenus de la façon suivante :

100 grammes de poudre de feuilles sont épuisés rapidement à l'alcool à 60° ; comme précédemment, le marc est mis à macérer douze heures dans de l'eau distillée, additionnée de quelques gouttes de toluène (pour éviter toute fermentation). On filtre, on presse le marc, et on ajoute au liquide obtenu trois volumes d'alcool à 95°. On recueille le précipité, qui est lavé à l'alcool, puis à l'éther, et enfin desséché dans le vide sulfurique : 100 grammes de feuilles chloroformées ont ainsi fourni 1 g.,10 d'extrait fermentaire (tandis que les feuilles témoin n'en ont donné que 0 g.,90).

Essais des poudres et extraits fermentaires. — En dehors de l'essai sur le salicoside et de l'amygdaloside, il nous a semblé logique d'essayer ces produits fermentaires sur le monotropioside, hétéroside existant chez la Gaulthérie.

Nous avons donc tenté l'extraction de cet hétéroside des

feuilles sèches, suivant le procédé indiqué par BRIDEL et S. GRILLON [58]. Nous avons fait cristalliser le monotropitoside dans l'éther acétique hydraté, nous l'avons purifié par cristallisation dans l'acétone. Le rendement a été très faible : 2 g.,50 par kilogramme de feuilles sèches, et malheureusement nous n'avons pas pu trouver de feuilles fraîches.

Monotropitoside à 1 p. 100 + 0 g.,50 p. 100 de produit fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 5 jours	Après 10 jours	Après 15 jours
Poudre fermentaire témoin	— 1°8'	± 0	+ 4'	+ 8'
Poudre fermentaire chloroformée .	— 1°8'	+ 2'	+ 4'	+ 10'
Extrait fermentaire témoin	— 1°8'	— 1°6'	— 5° 4'	— 50'
Extrait fermentaire chloroformé ..	— 1°8'	— 1°6'	— 54'	— 48'

Salicoside à 1 p. 100 + 0 g.,50 p. 100 de produit fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 5 jours	Après 15 jours
Poudre fermentaire témoin	— 1°16'	— 20'	+ 32'
Poudre fermentaire chloroformée .	— 1°16'	— 20'	+ 30'
Extrait fermentaire témoin	— 1°16'	— 1°12'	— 1° 6'
Extrait fermentaire chloroformé...	— 1°16'	— 1°10'	— 1° 4'

Amygdaloside à 1 p. 100 + 0 g.,50 p. 100 de produit fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 5 jours	Après 15 jours
Poudre fermentaire témoin	— 44'	± 0	+ 20'
Poudre fermentaire chloroformée .	— 44'	+ 2'	+ 22'
Extrait fermentaire témoin	— 44'	— 42'	— 40'
Extrait fermentaire chloroformé ..	— 44'	— 40'	— 36'

Les produits fermentaires chloroformés ne sont pas plus actifs que les témoins, au point de vue primevérosidase, salicoidase et amygdaloidase.

Il en a été de même avec les poudres fermentaires éthérées, formolées, acroléinées.

Les extraits fermentaires sont beaucoup moins actifs que les poudres fermentaires. Ce fait avait déjà été signalé par Mme S. RABATÉ [180].

Les ferments sont restés « accrochés » aux tissus, même après action du chloroforme.

Nous avons déjà rencontré les mêmes phénomènes avec les produits fermentaires d'*Ancuba* et de Laurier-cerise et de nombreux faits analogues ont déjà été signalés. Rappelons entre autres que H. HÉRISSEY [133] a constaté que la géosidase, ferment proche de la rhamnodiastase, hydrolysant le géoside en eugénol et vicianose (arabinose + glucose) et présent en petite quantité dans le mycélium d'*Aspergillus niger*, ne semble pas diffuser dans le liquide de culture. Tant que nous n'aurons pas de moyen pour « décrocher » les ferments des tissus, il faudra donc souvent préférer les poudres fermentaires aux extraits fermentaires.

2° EXPÉRIENCES SUR LES GRAINES D'AVIGNON.

On désigne sous le nom impropre de « graines d'Avignon » les fruits desséchés du *Rhamnus infectoria*, autrefois utilisés comme matière colorante.

Elles contiennent un hétéroside, le xanthorhamnoside (ou xanthorhamnine) étudié par C. et G. TANRET [191] ; sous l'influence du ferment contenu dans les graines d'Avignon (analogue à la rhamnodiastase) cet hétéroside se dédouble en un trioside, le rhamninoase et rhamnetine ou méthylquercétine. Par hydrolyse acide, le rhamninoase [190] se dédouble en donnant deux molécules de rhamnose et une molécule de galactose.

Signalons que le xanthorhamnoside a été retrouvé dans d'autres Rhamnacées, en particulier dans les baies de Nerprun (*Rhamnus cathartica*).

Nous nous sommes proposé de rechercher si l'influence du chloroforme, en vapeur saturante, provoquerait des variations de l'hétéroside tributaire de la rhamnodiastase,

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XVII. — Action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine en vapeur saturante sur les graines d'Avignon (1).

	Témoin	CHCl ³ 2 heures	Ether 2 heures	Formol 2 heures	Acroléine 2 heures
<i>Déviation :</i>					
Avant rhamnodiastase...	— 40'	— 54'	— 48'	— 38'	— 48'
Après rhamnodiastase...	— 8°40'	— 8°40'	— 8°44'	— 8°40'	— 8°50'
<i>Sucre réducteur :</i>					
Avant rhamnodiastase...	570	667	492	570	570
Après rhamnodiastase...	4.884	4.558	4.712	4.884	4.896
<i>Action de la rhamno- diastase :</i>					
Recul de la dérivation...	8°	7°46'	7°56'	8°2'	8°2'
Sucre réducteur formé...	4.314	3.891	4.222	4.314	4.326

Sous l'influence du chloroforme, il y a eu une légère hydrolyse (environ 10 p. 100) de l'hétéroside, le xanthorhamnoside ; l'action de l'éther est moins marquée ; même chez les fruits, le chloroforme est capable d'accélérer l'hydrolyse des hétérosides tributaires de la rhamnodiastase.

Il n'y a pas de changement appréciable avec le formol et l'acroléine.

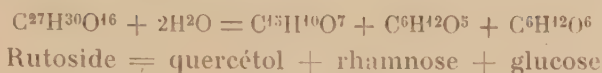
3° EXPÉRIENCES SUR LA RUE (*Ruta graveolens*).

Nous avons employé la plante à l'état frais.

Elle contient un hétéroside, le rutoside, isolé en 1842 par WEISS [197]. Mais ce n'est qu'en 1904 qu'on connut, grâce aux travaux de SCHMIDT [185] la formule exacte du rutoside et de ses produits de dédoublement. Le rutoside est presque insoluble dans l'eau froide, il est soluble dans l'alcool fort, la pyridine. Traité par les acides minéraux étendus et bouillants, il se dédouble en donnant une molécule de quercétol (quercétine) une molécule de rhamnose et une molécule de glucose, dont la présence avait été inconnue jusqu'aux travaux de SCHMIDT. La

(1) Ces graines avaient été, au préalable, trempées dans l'eau froide pendant 24 heures.

formule de dédoublement par hydrolyse acide peut donc s'écrire :



Depuis lors, le rutoside a été retrouvé dans un grand nombre de végétaux (voir à ce sujet l'article très documenté de CHARAUX [63]) et GOLLAN [106], en 1929, remarquait que c'était l'hétéroside le plus répandu dans le règne végétal.

Il faut attendre les travaux de CHARAUX [62], en 1924, pour la réalisation de l'hydrolyse fermentaire du rutoside, et l'obtention du bioside formé par le glucose et le rhamnose.

Plusieurs tentatives avaient cependant été faites dans ce but.

WUNDERLICH [204] avait essayé d'hydrolyser le rutoside à l'aide d'un extrait ou d'une poudre fermentaire de Rue. Mais l'hétéroside était resté inaltéré. C'est là un fait intéressant à noter : on ne peut pas extraire de la Rue un ferment capable d'hydrolyser le rutoside.

Il y a là une exception à la règle générale, les plantes contenant, en général, les ferments correspondants aux holosides qu'elles fermentent. Nous reviendrons d'ailleurs sur ce sujet.

CHARAUX [62] eut l'idée de faire agir sur le rutoside le ferment des graines de *Rhamnus*, connu par la suite sous le nom de rhamnodiastase, et obtint le dédoublement de cet hétéroside en quercétol et en un bioside formé par l'union d'une molécule de rhamnose et d'une molécule de glucose.

Ce nouvel holoside, appelé « rutinose » par CHARAUX, est sensiblement inactif sur la lumière polarisée en solution aqueuse ; son pouvoir réducteur est de 0,68 par rapport au glucose. Il sera donc assez difficile de suivre l'hydrolyse du rutoside par les variations de la déviation polarimétrique, celle-ci étant peu marquée ; il vaudra mieux observer les variations du pouvoir réducteur.

Ainsi, la Rue contient du rutoside et ne semble pas renfermer le ferment correspondant : la rhamnodiastase. Ce ferment existe peut-être dans la plante, mais à l'état dissimulé. Sous l'influence des vapeurs de chloroforme, d'éther, de formol, d'acroléine, arriverait-on à le démasquer et à provoquer des variations de la quantité de rutoside ? C'est ce que nous nous sommes proposé de rechercher.

Pour cela, nous avons fait agir les différentes vapeurs envi-

sagées pendant des temps plus ou moins longs (de 2 heures à 12 heures) ; nous n'avons pas obtenu de variation sensible de la quantité d'hétéroside dédoublable par la rhamnodiastase. Nous avons refait les mêmes expériences à différentes époques de la végétation, plusieurs années consécutives ; les résultats ont toujours été négatifs.

Voici, à titre d'exemple, une des expériences les plus récentes (juin 1935) après action du chloroforme en vapeur saturante pendant douze heures :

TABLEAU XVIII. — *Action du chloroforme en vapeur saturante sur des feuilles fraîches de Rue.*

	Témoin 12 heures	CHCl ₃ 12 heures
<i>Déviation :</i>		
Avant rhamnodiastase.....	+ 1°	— 8'
Après rhamnodiastase.....	+ 1°12'	+ 4'
<i>Sucre réducteur :</i>		
Avant rhamnodiastase.....	1.480	1.500
Après rhamnodiastase.....	1.568	1.578
<i>Action de la rhamnodiastase :</i>		
Retour de la déviation	12'	12'
Sucre réducteur formé	88	78

La légère hydrolyse est de l'ordre des erreurs d'expérience. Notons également les faibles changements provoqués par l'action de la rhamnodiastase. Les variations sont ici plus difficilement appréciables que dans le cas de la méthode biochimique à l'émulsine.

Nous avons préparé des poudres fermentaires de feuilles que nous avons essayées sur le rutoside. Cet hétéroside a été préparé par nous-même à partir des feuilles fraîches, ou des sommités fleuries de Rue, d'après le procédé de CHARAUX [63].

La plante, passée au hachoir universel, est épuisée par l'alcool à 90° bouillant à plusieurs reprises. On réunit les liqueurs alcooliques, on distille sous pression réduite ; l'extract est repris par l'eau bouillante. On filtre, on dégraisse avec de l'éther employé en plusieurs fois ; on laisse cristalliser ; on recueille

les cristaux, on lave à l'éther ; on purifie par une deuxième cristallisation dans l'eau bouillante (en présence de quelques gouttes de solution officinale de bisulfite pour éviter l'oxydation du rutoside).

Nous avons ainsi obtenu de bons rendements (5 grammes par kilogramme de plante fraîche). Par contre, le rendement était moins élevé avec de la Rue sèche, coupée, provenant de diverses maisons de droguerie.

Cette Rue était-elle de mauvaise qualité, mélangée avec d'autres plantes ne contenant pas de rutoside ? avait-elle été récoltée à un mauvais moment ? ou y avait-il destruction partielle du rutoside au cours de la dessiccation ?

Nous avons entrepris un certain nombre de recherches à ce sujet. Malheureusement, ces expériences doivent porter sur plusieurs années et il est encore trop tôt pour formuler des conclusions. Elles feront l'objet d'un travail ultérieur.

En possession d'une certaine quantité de rutoside, nous avons pu essayer des poudres et extraits fermentaires de Rue après action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine. Dans aucun cas, nous n'avons pu obtenir une hydrolyse sensible du rutoside.

Peut-être le ferment existe-t-il à un certain moment de la végétation ; peut-être est-il localisé ailleurs que dans les feuilles ou les tiges : dans les graines par exemple. Nous continuons nos recherches sur ce sujet.

B. — Étude de la rhamnodiastase *in vitro*.

Nous avons fait intervenir le chloroforme, le formol, l'éther, l'acroléine : d'une part, aux différents stades de la préparation de la rhamnodiastase ; d'autre part, au cours de l'hydrolyse du rutoside.

La matière première employée était constituée par des fruits desséchés de *Rhamnus utilis*. Nous décrirons d'abord la préparation de la rhamnodiastase témoin, selon la technique préconisée par BRIDEL et CHARAUX [53].

Les fruits de *Rhamnus utilis* sont broyés au moulin ; on élimine la plus grande partie des léguments par tamisage. On recueille la poudre grisâtre constituée par l'amande de la graine ; on pulvérise de nouveau. Le produit obtenu est épuisé à l'éther pour éliminer l'huile ; la poudre desséchée est mise à

macérer douze heures dans 3 fois son volume d'eau distillée additionnée de quelques gouttes de toluène. Après expression du marc et filtration du liquide obtenu, on ajoute au filtrat 4 fois son volume d'alcool à 95°. Le précipité est recueilli sur entonnoir de Büchner, lavé à l'alcool, puis à l'éther et enfin séché dans le vide sulfurique. Nous avons ainsi obtenu de 16 à 18 grammes d'extrait fermentaire (par kg. de fruit de *Rhamnus utilis*) hydrolysant très rapidement le rutoside ; le rendement est de beaucoup inférieur à celui obtenu par BRIDEL et CHARRAUX [53]. Cela tient vraisemblablement à ce que nous avons employé des fruits desséchés au lieu de graines récentes. Nous n'avons pu, en effet, nous procurer des fruits frais de *Rhamnus utilis* et, chez les fruits desséchés, la séparation des graines d'avec l'épicarpe et la pulpe est très difficile, pour ne pas dire impossible.

On voit qu'il est néanmoins possible d'obtenir de la rhamnodiastase à partir des fruits ; le rendement étant simplement inférieur (1) et la manipulation un peu plus longue. Il faut partir de fruits bien secs de façon à pouvoir les pulvériser très finement par plusieurs passages dans un moulin à café. De plus, il faut épuiser la poudre (qu'on a intérêt à additionner de sable) par une grande quantité d'éther, de façon à éliminer non seulement les matières grasses, mais aussi les matières colorantes.

Nous avons essayé de faire gonfler les fruits dans l'eau et de faire germer les graines afin d'extraire le ferment, mais ce procédé ne nous a pas donné de bons résultats.

Nous avons soumis des fruits pulvérisés aux vapeurs saturantes de chloroforme, d'éther, de formol et d'acroléine pendant 4 heures, en atmosphère humide, avant le dégraissage à l'éther et la macération dans l'eau les lots chloroformés nous ont donné un rendement légèrement supérieur (environ 10 p. 100) mais l'activité semblable à celle des témoins vis-à-vis du rutoside. Les lots formolés et acroléinés n'ont pas présenté de modifications par rapport au témoin.

Voyons maintenant l'action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine sur l'action hydrolysante de la rhamnodiastase.

Nous n'avons envisagé que l'action de la rhamnodiastase sur le rutoside, n'ayant pas de primevéroside, ni de xanthoramno-

(1) A. MEUNIER [157] a également obtenu de faibles rendements.

side à notre disposition. (Nous avons essayé d'extraire du monotropitose des feuilles sèches de Gaulthérie, mais nous avons vu que celles-ci ne contenaient presque plus d'hétérosides).

Le chloroforme et l'éther ne gênent nullement l'hydrolyse du rutoside par la rhamnodiastase. Nous avons vu que ces substances ne modifiaient pas non plus l'activité de l'émulsine et l'invertine *in vitro*.

Quant à l'action du formol et de l'acroléine, il est difficile d'en juger avec précision. En effet, nous avons déjà dit que l'hydrolyse du rutoside ne pouvait être suivie que par la détermination du pouvoir réducteur, or, en présence de formol et d'acroléine ce dosage devient impossible.

Nous avons essayé de doser le quercétol (1) provenant du déboulement du rutoside, mais, étant donné les petites quantités sur lesquelles on opère, ce dosage est peu précis.

Nous avons également essayé d'éliminer le formol par le dimédon, avant de doser les sucres réducteurs. Cette méthode nous oblige à diluer les liqueurs, introduisant par là même des causes d'erreurs ; elle nous a permis cependant de constater que la rhamnodiastase était relativement peu sensible à l'action du formol. Il faut atteindre la concentration de 10 p. 100 pour que l'influence retardatrice se fasse sentir. La rhamnodiastase semblerait donc moins sensible à l'action du formol que l'émulsine et même que l'invertine.

(1) A l'état de dérivé bromé.

CONCLUSIONS.

L'étude de certaines plantes contenant de la rhamnodiastase et des hétérosides dédoublables par ce ferment, nous a montré que, sous l'influence des vapeurs de chloroforme et d'éther, il y avait hydrolyse des hétérosides. Il en a été ainsi avec des feuilles sèches de Gaulthérie (en 4 heures avec le chloroforme, en vapeur saturante, on a constaté une diminution de 40 p. 100 du monotropitoside) et avec les fruits desséchés du *Rhamnus infectoria* (Graines d'Avignon) (chez lequel nous avons constaté une diminution de 10 p. 100 du xanthorhamnoside après deux heures d'action du chloroforme en vapeur saturante).

Nous espérons étudier en détail la Rue à l'état frais ; malheureusement, si cette plante contient bien un hétéroside hydrolysable par la rhamnodiastase, nous n'avons pu y déceler le ferment correspondant. Peut être avons nous procédé à un moment de la végétation où le ferment avait disparu ? Nous continuons nos recherches à ce sujet.

Quant à l'étude *in vitro*, nous avons constaté que, ni le chloroforme, ni l'éther n'entraient l'hydrolyse du rutoside par la rhamnodiastase. Pour ce qui est du formol (ou de l'acroléine), le phénomène est difficile à suivre étant donné que seule ici convient la méthode par détermination des sucres réducteurs, détermination qui est troublée par la présence de formol. Néanmoins, il nous a semblé que la rhamnodiastase était peu sensible à l'action du formol.

TROISIÈME PARTIE.

Étude de la myrosine.

Généralités. — La myrosine (qu'on doit appeler myronase suivant la nouvelle nomenclature) est le ferment spécifique des hétérosides sulfurés qu'on rencontre chez les Crucifères, les Capparidacées, les Tropéolées, etc... (GUIGNARD [115]).

C'est, d'une part BUSSY [61], d'autre part BOUTRON et FRÉMY [43] qui, en 1839, au cours de leurs travaux sur les semences de Moutarde noire et blanche, isolèrent la myrosine et montrèrent que la formation d'essence était dûe à l'action de ce ferment.

Dans ses remarquables travaux sur la localisation des principes actifs chez les Crucifères, GUIGNARD [115] à l'aide de techniques microscopiques, montra l'existence de cellules spéciales, riches en albumine, se colorant en violet à chaud sous l'influence de l'acide chlorhydrique pur, et en rose avec le réactif de MILON, et qu'il considéra comme des cellules à myrosine.

En effet, ces cellules, isolées des tissus, sont capables de décomposer les hétérosides sulfurés. En 1894, ce savant [116] indiqua plusieurs procédés de préparation et quelques propriétés de la Myrosine.

Comme matériel d'étude, nous avons employé les semences de Moutarde noire (*Brassica nigra* Koch.). On sait que ces graines, employées en pharmacie sous forme de poudre grossière ou farine de moutarde, doivent leurs propriétés révulsivantes à la production d'essence de moutarde (isosulfocyanate d'allyle ou al'ylsénévol) n'existant pas à l'état libre mais provenant du dédoublement (par la myrosine et en présence d'eau) d'un hétéroside sulfuré, le sinigroside.

Cet hétéroside fut découvert en 1840 par Bussy [61] qui l'appela myronate de potasse, le considérant comme le sel de l'acide myronique. La constitution chimique fut établie par la suite par WILL, BILLETER, GADAMEZ, etc... (voir à ce sujet la thèse très documentée de BOIVIN [15]).

Comme pour l'émulsine, l'invertine, la rhamnodiastase, nous nous sommes proposé de rechercher quelle était l'action de quelques substances organiques (chloroforme, éther, formol, acroléine) sur la myrosine. Notre étude n'a porté que sur la myrosine *in vivo*. En effet, pour étudier l'action des substances envisagées sur l'action hydrolysante de la myrosine *in vitro*, il aurait fallu disposer d'au moins 10 grammes de sinigroside cristallisé. Nous n'avons malheureusement pas pu nous procurer une telle quantité d'hétéroside ; d'autre part, le temps nous a manqué pour tenter l'extraction d'une quantité assez forte d'hétéroside. Nous espérons pouvoir le faire ultérieurement.

Etude de la myrosine *in vivo*.

Nous avons donc fait agir des vapeurs de chloroforme, de formol et d'acroléine pendant des temps variables sur des semences de Moutarde noire.

Nous espérons pouvoir suivre (comme nous l'avons fait pour l'émulsine, l'invertine, la rhamnodiastase) l'action sur la myrosine par la mesure des variations des hétérosides dédoublables par ce ferment à l'aide de la méthode biochimique. En effet, en 1910, un élève de BOURQUELOT, J. VINTILESCO [194] a proposé une méthode biochimique à la myrosine, calquée sur la méthode à l'émulsine de BOURQUELOT.

Malheureusement, cette méthode qui a donné de bons résultats à l'auteur pour la recherche d'hétérosides hydrolysables par la myrosine, nous a paru d'application plus difficile quand il s'agissait, non plus de la recherche, mais du dosage de ces mêmes hétérosides (1).

Nous avons donc eu recours, comme dans le cas du Laurier-cerise, au dosage de l'aglycone provenant du dédoublement diastasique, l'essence de moutarde.

Le dosage de l'essence sulfurée de Moutarde noire a fait l'ob-

(1) En dehors de la Moutarde noire, nous avons tenté également de faire des essais biochimiques avec la Gaude (*Reseda luteola*).

jet de nombreuses recherches. Parmi les plus récentes, nous citerons celles de R. BOIVIN [15], où l'on trouvera la critique de travaux antérieurs, celle de GARBIT [102] et enfin celles de GROS et PICHON [109].

Nous avons suivi, à quelques détails près, la méthode officielle de la Pharmacopée française (1908 et 1925) avec les modifications proposées par BOIVIN [15] (le titrage final est effectué avec une solution décimale de sulfocyanate, et on évite les lavages du sulfure d'argent avec un grand volume d'eau).

Voici donc la technique suivie :

5 grammes de graines de Moutarde sont broyées finement en présence de sable. On ajoute 100 cm³ d'eau distillée et on introduit dans un ballon de 250 cm³ pouvant s'adapter à l'appareil de DOMERGUE [88] (appareil à distiller, tout en verre Pyrex, sans aucun joint en caoutchouc). On bouche, et on laisse 1 heure à la température du laboratoire en ayant soin d'agiter de temps en temps. On ajoute ensuite 20 cm³ d'alcool à 90° et 2 cm³ d'huile d'olive. On relie à l'appareil de DOMERGUE à l'aide du bouchon rodé ; on distille lentement, en chauffant au bain de glycérine ; on recueille le liquide dans un ballon jaugé de 100 cm³ contenant 10 cm³ d'ammoniaque officinale. On arrête la distillation quand le contenu du ballon a atteint environ 75 cm³. Nous avons ajouté alors 20 cm³ de solution décimale de nitrate d'argent. Le flacon est bouché et laissé à l'obscurité au moins douze heures ; on décante sur un filtre sans plis et on lave une deuxième fois avec 10 cm³ d'eau distillée.

Au filtrat, on ajoute 10 cm³ d'acide azotique officinal et 1 cm³ de solution d'alun de fer ammoniacal à 10 p. 100. A l'aide d'une burette graduée, on ajoute de la solution décimale de sulfocyanate de potassium jusqu'à faible coloration rouge. Soit N le nombre de centimètres cubes de solution décimale employé — la différence (1,98-0,099 N) représentera la quantité d'allylsénévol formé par 100 grammes de graines de Moutarde noire. Les graines de Moutarde dont nous nous sommes servi donnaient par cette méthode de 0,70 à 0,72 p. 100 d'allylsénévol.

Nous avons fait agir le chloroforme, l'éther, le formol, l'acroléine à forte dose (vapeur saturante) et à faible dose.

Notons dès maintenant que le formol et l'acroléine n'ont pas provoqué de changement par rapport aux témoins. L'éther nous a donné quelques variations, mais beaucoup moins mar-

quées que dans le cas du chloroforme. Nous n'exposerons donc ici que les résultats obtenus avec le chloroforme.

Des essais préliminaires nous ayant montré que l'action était d'autant plus marquée que les graines étaient plus humides, nous avons, au préalable, fait gonfler celles-ci dans deux fois leur poids d'eau distillée pendant deux heures ; puis nous avons soumis ces graines (par lots de 5 grammes) au chloroforme en vapeur saturante pendant une heure, deux heures et quatre heures.

Voici les résultats obtenus :

	Témoin	CHCl ³	Témoin	CHCl ³	Témoin	CHCl ³
	1 h.	1 h.	2 h.	2 h.	4 h.	4 h.
	—	—	—	—	—	—
Teneur en allylsénévol (p. 100 g. de graines sèches).	0,66	0,71	0,64	0,74	0,61	0,88

On remarque que la quantité d'allylsénévol a diminué chez les témoins par rapport au témoin initial, tandis qu'elle a augmenté chez les lots chloroformés.

Nous avons fait d'autres expériences sur des graines germées, dont une partie était mise ensuite dans de l'air contenant 1 p. 1000 de chloroforme :

	Témoin	CHCl ³	Témoin	CHCl ³
	1 j.	1 j.	2 j.	2 j.
	—	—	—	—
Teneur en allylsénévol (p. 100 g. graines sèches).....	0,38	0,81	0,37	1,05

L'allylsénévol a considérablement baissé au cours de la germination ; il a, au contraire, augmenté chez les lots chloroformés.

Nous arrivons donc à cette conclusion, que les lots soumis à l'action du chloroforme fournissent plus d'allylsénévol que les témoins. Rappelons que nous étions arrivé à des conclusions analogues à propos du dosage de l'acide cyanhydrique total chez les feuilles de Laurier-cerise.

Comment expliquer cette augmentation d'allylsénévol chez les lots chloroformés ?

Plusieurs explications sont possibles : en présence du chloroforme, l'hydrolyse de l'hétéroside serait plus complète que chez les témoins. D'autre part, on peut admettre que, sous l'influence de l'anesthésique, il y a eu stimulation à la fois de l'activité hydrolysante et synthétisante de la myrosine *in vivo*.

Enfin, il est possible que ces deux mécanismes interviennent en même temps.

Il est évident que, dans le cas des graines de Moutarde noire, ces expériences sont insuffisantes pour affirmer la synthèse du sinigroside *in vivo* sous l'influence des anesthésiques, et il peut se former autre chose que cet hétéroside. Néanmoins, l'hypothèse n'est pas à rejeter et la question mérite d'être posée, d'autant plus que nous avons déjà discuté de phénomènes semblables à propos de l'émulsine et de l'invertine.

CONCLUSIONS.

Nous avons choisi comme plante à myrosine la Moutarde noire, dont la composition chimique est bien connue.

Nous n'avons pu, dans ce cas particulier, suivre les variations de l'hétéroside, sous l'influence des différentes vapeurs, à l'aide d'une méthode biochimique. En effet la méthode biochimique à la myrosine, si elle convient bien pour la recherche des hétérosides sulfurés, ne nous a pas semblé suffisamment précise pour doser ces mêmes hétérosides.

Nous avons donc dosé l'aglycone (provenant du dédoublement du sinigroside) : l'allylsénévol ou essence de Moutarde.

Sous l'influence du chloroforme (l'éther nous a donné des variations moins fortes) : aussi bien en vapeur saturante qu'en atmosphère au millième, nous avons obtenu une augmentation de la quantité d'allylsénévol, par rapport au témoin.

Il y a là un fait analogue à celui constaté avec les feuilles de Laurier-cerise, et nous pensons qu'à cette augmentation en allylsénévol correspond une synthèse d'hétéroside sulfuré.

Quant à l'étude de la myrosine *in vitro* elle n'a pu être réalisée n'ayant pas à notre disposition une quantité suffisamment grande de sinigroside (myronate de potasse).

QUATRIÈME PARTIE.

A. — Etude de l'invertine (ou sucrase) « in vivo »

Choix du matériel d'étude et technique employée.

L'invertine, appelée également sucrase, invertase, saccharase, est la plus répandue des glucidases ; elle hydrolyse le sucre de canne ou saccharose, lui-même le plus commun de tous les glucides.

Presque tous les végétaux renferment de l'invertine : les levures (qui en sont particulièrement riches, puisque la levure de bière constitue la meilleure source d'invertine), les moisissures (*Aspergillus niger*) et les plantes vertes chez lesquelles l'invertine accompagne le saccharose, produit de l'assimilation chlorophyllienne, très répandu chez les Dicotylédones, mais beaucoup moins abondant chez les Monocotylédones.

Cette étude de l'invertine a été conduite comme celle de l'émulsine et suivant des techniques analogues.

Nous avons repris comme matériel d'étude les feuilles d'*Antica* et de Laurier-cerise, déjà étudiées à propos de l'émulsine.

Nous avons fait également quelques expériences avec la Rue et la Gaulthérie, plantes dont nous avons déjà parlé à propos de la rhamnodiastase, ainsi qu'avec la banane, que nous étudierons en détail lors de l'étude de l'amylase.

Sur ces végétaux, nous avons fait agir des vapeurs de chloroforme ou d'éther, de formol ou d'acroléine, à forte ou à faible dose, pendant des temps variables. Nous avons jugé des effets obtenus sur l'invertine en déterminant les variations du saccharose à l'aide de la méthode biochimique de BOURQUELOT.

De plus, nous avons extrait les poudres fermentaires après

action des différentes substances étudiées et nous avons comparé leur activité à celle des témoins.

Les techniques employées seront donc semblables à celles dont nous avons déjà parlé lors de l'étude de l'émulsine ; nous ne décrirons donc ni la technique de préparation des poudres fermentaires, ni la méthode biochimique de BOURQUELOT. Cependant, nous dirons quelques mots de la spécificité de cette dernière.

Spécificité de la méthode biochimique à l'invertine. — Lors de sa création en 1907, à la suite des beaux travaux de BOURQUELOT, on croyait que l'invertine ne s'attaquait qu'au saccharose libre ou combiné (gentianose, raffinose, stachyose, verbascose) et qu'elle était spécifique de la liaison glucose-fructose. Mais, en 1920, des faits nouveaux vinrent modifier cette conception de la spécificité de l'invertine. COLIN remarqua que l'autolysat de levure était capable d'hydrolyser certains fructoholosides : la pseudo-inuline, l'hélianthénine, la synanthrine et même un glucoholoside, la laminarine.

Ces faits, très intéressants au point de vue de la conception de la spécificité fermentaire, n'altèrent en rien la valeur de la méthode biochimique à l'invertine, car les fructoholosides (lévulosanes), très abondants chez les Monocotylédones (1), se rencontrent rarement chez les Dicotylédones, si bien que dans ce cas l'invertine reste spécifique de la liaison glucose-fructose. De plus, l'indice de réduction enzymolytique peut donner une idée de la nature des holosides présents.

Enfin, nous rappellerons que dans l'invertine préparée suivant la méthode de BOURQUELOT on ne trouve ni amygdalase, ni amylase, ni maltase [38-97].

Action du chloroforme sur l'invertine *in vivo*.

Travaux antérieurs. — L'action du chloroforme sur différentes plantes, au point de vue de leur teneur en saccharose, a déjà été envisagée par différents auteurs.

Nous citerons tout d'abord les expériences de MAZÉ [156] sur la Betterave.

MAZÉ opère sur des morceaux de racine de Betterave, contenant 7,5 p. 100 de saccharose, qu'il met dans de l'eau chloro-

(1) Dans le cas de la Scille par exemple, nous avons pu constater qu'il y avait hydrolyse des lévulosanes sous l'influence des vapeurs de chloroforme et d'éther.

formée à différents titres pendant plusieurs jours à l'étuve à 30°. Il constate une augmentation du sucre interverti par rapport aux témoins. Il conclut que le chloroforme augmente l'activité de la sucrase ou, plus vraisemblablement, qu'il provoque une sécrétion plus abondante de ce ferment.

Plus importantes sont les expériences de M. MASCRÉ [155], qui, en collaboration avec POUSSET, étudia les variations des glucides de la feuilles d'*Aucuba japonica* Thunb. sous l'action du chloroforme.

Ces auteurs constatèrent une diminution des holosides dédoublables par l'invertine (8 p. 100 pour 3 heures de vapeur saturante ; 12 p. 100 pour 5 heures). Cependant pour une durée d'une heure, il y a au contraire augmentation des holosides.

Ces expériences furent étendues par POUSSET [176] à d'autres plantes.

Pour les feuilles de Troène (*Ligustrum japonicum* Hort.) sous l'influence du chloroforme en vapeur saturante il y a une hydrolyse de 26 p. 100 en trois heures, de 27 p. 100 en six heures.

Dans l'air saturé de chloroforme il y a peu de changement au bout d'une heure, une hydrolyse de 19 p. 100 en 3 heures, de 71 p. 100 en 6 heures.

Avec l'écorcé de Marronnier (*Æsculus Hippocastanum* L.), en vapeur saturante il n'y a pas de changement après deux heures et une hydrolyse de 8 p. 100 après 8 heures.

Enfin, certaines expériences de POUSSET ont porté sur des fruits d'Orge ou des graines de Pois en cours de germination. Dans ce cas aussi, sous l'influence du chloroforme, il y a une forte diminution et quelquefois même disparition totale du saccharose.

Il semble donc que, quel que soit le végétal employé, il y ait sous l'influence du chloroforme stimulation de l'action hydrolysante de l'invertine. Il semble cependant que la proportion d'holosides hydrolysés en vapeur saturante, toutes choses égales d'ailleurs, est inférieure à celle des hétérosides. En employant de petites doses et en prolongeant l'action, ne pourrait-on pas arriver à l'hydrolyse totale des holosides ?

D'autre part, avant cette prédominance de l'action hydrolysante, n'y aurait-il pas prédominance de l'action synthétisante, ainsi que nous l'avons vu pour les hétérosides, dans certains cas, lors de notre étude de l'émulsine *in vivo* ?

Sous l'influence du chloroforme, y aurait-il uniquement hydrolyse des holosides ?

C'est dans ce sens que nous avons orienté nos recherches sur l'action de l'invertine *in vivo* sous l'influence de différentes doses de chloroforme.

1^e. EXPÉRIENCES SUR LES FEUILLES D'*Aucuba japonica*.

Etant donnés les travaux déjà faits sur ce sujet par MASCRÉ et POUSSET, notre étude de l'action du chloroforme *in vivo*, au point de vue de l'invertine, sur les feuilles d'*Aucuba*, sera restreinte.

Nous avons simplement fait agir le chloroforme 1 heure en vapeur saturante et 4 jours à la concentration de 1 p. 1000.

La première expérience a été réalisée parce que MASCRÉ et POUSSET [155] avaient constaté qu'au bout d'une heure il y avait, non pas diminution (comme cela a lieu pour un temps plus prolongé), mais augmentation des sucres dédoublables par l'invertine ; la seconde parce que les expériences de POUSSET n'avaient pas excédé 8 heures et que dans ces conditions la proportion d'holosides dédoublés n'avait pas dépassé 26 p. 100.

Voici les résultats obtenus : (les expériences ont été réalisées au mois de mars).

TABLEAU XIX. — Action du chloroforme sur les feuilles d'*Aucuba*.

	Témoin 1 heure	1 heure CHCl ₃ vap. saturante	Témoin 4 jours	4 jours CHCl ₃ à 1 p. 1000
<i>Déviatiou :</i>				
Avant invertine.....	— 10°	+ 1°52'	— 10°20'	+ 2°20'
Après invertine.....	— 11°46'	± 0	— 12°16'	+ 1°52'
<i>Sucre réducteur :</i>				
Avant invertine.....	950	1.915	1.000	3.810
Après invertine.....	2.221	3.288	2.221	3.966
<i>Action de l'invertine :</i>				
Recul de la déviation....	1°46'	1°52'	1°56'	28'
Sucre réducteur formé ..	1.271	1.373	1.221	156
<i>Indice.....</i>				
Indice.....	722	738	632	339

Ainsi donc, il y a, sous l'influence des vapeurs de chloroforme :

1° pour une heure de vapeur saturante, *augmentation* (8 p. 100) des holosides dédoublables par l'invertine ;

2° pour 4 jours dans une atmosphère à 1 p. 1000, *diminution* de 87 p. 100.

Les poudres fermentaires correspondantes essayées sur le saccharose ont une activité analogue à celle des poudres témoins.

Nous avons donc retrouvé, pour une heure de vapeur saturante, le fait déjà constaté par MASCRÉ et POUSETT [155] qui, d'ailleurs, l'avaient signalé sans commentaire. A la lumière de nos expériences sur l'émulsine, *in vivo*, nous croyons pouvoir émettre l'hypothèse suivante au sujet de cette augmentation des holosides dédoublables par l'invertine :

Sous l'influence du chloroforme, il peut y avoir stimulation non seulement de l'action hydrolysante, mais aussi de l'action synthétisante des ferments avec prédominance de l'une ou de l'autre.

Avec l'*Aucuba*, au bout d'une heure de vapeur saturante, il y a prédominance de l'action synthétisante ; si l'on prolonge la durée de l'expérience, il y a prédominance de l'action hydrolysante.

Une autre question se pose : s'est-il formé du saccharose, ou un autre sucre tributaire de l'invertine ? Le calcul de l'indice, selon BOURQUELOT, donne un chiffre assez voisin (aux erreurs d'expériences près) du chiffre théorique (604) du saccharose.

Nous reviendrons d'ailleurs sur cette synthèse d'holosides *in vivo* lors de nos conclusions sur l'invertine.

Quant à la deuxième expérience, elle montre que de faibles doses prolongées provoquent une hydrolyse plus marquée que de fortes doses pendant un temps relativement court.

2° EXPÉRIENCES SUR LES FEUILLES DE LAURIER-CERISE.

Nous avons fait agir le chloroforme à forte dose (en vapeur saturante) et à faible dose (atmosphère contenant 1 p. 1000 de chloroforme) à la température du laboratoire (environ 20°). L'action sur l'invertine *in vivo* a été appréciée comme précédemment à l'aide de la méthode biochimique à l'invertine.

Nous avons procédé sur des lots de 100 grammes de feuilles aussi identiques entre eux que possible. La composition chimique, variant avec l'époque de la végétation, nous avons indiqué pour chaque expérience le mois pendant lequel elle a été réalisée.

L'examen des liqueurs a été effectué comme précédemment, c'est-à-dire après défécation à l'extrait de Saturne et élimination du plomb par le sulfate de soude.

Prise d'essai	25 cm ³
Extrait de Saturne	5 cm ³
Sulfate de soude à 10 p. 100 q.s. pour....	50 cm ³

On obtient ainsi des solutions parfaitement limpides pour l'examen polarimétrique et le dosage des sucres réducteurs suivant la méthode de G. BERTRAND.

Voici les résultats obtenus avec le chloroforme en vapeur saturante :

TABLEAU XX. — *Action du chloroforme en vapeur saturante sur les feuilles de Laurier-cerise.*

	Témoin 1 heure	CHCl ³ 1 heure	Témoin 2 heures	CHCl ³ 2 heures	Témoin 4 heures	CHCl ³ 4 heures
<i>Déviation :</i>						
Avant invertine	+ 20'	± 0	— 1°	— 2°48'	— 16'	— 1°24'
Après invertine	— 2°10'	— 1°40'	— 2°16'	— 3°12'	+ 1°52'	— 2°
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine,	900	1.300	705	1.211	920	1.600
Après invertine	1.853	1.955	1.693	1.693	1.892	1.982
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul déviation ...	2°30'	1°40'	1°16'	24'	2°8'	36'
S. R. formé.	953	655	988	482	972	382
Date de l'expérience.	Novembre		Janvier		Novembre	

Variations des holosides dédoublables par l'invertine :

1 heure en vapeur saturante de chloroforme : Sucre réducteur (exprimé en glucose) : 655 mg.

Diminution par rapport au témoin = 31 p. 100.

2 heures en vapeur saturante : Sucre réducteur (exprimé en glucose) 482 mg.

Diminution par rapport au témoin = 51 p. 100.

4 heures en vapeur saturante : Sucre réducteur (exprimé en glucose) : 382 m.

Diminution par rapport au témoin = 61 p. 100.

En vapeur saturante, il y donc hydrolyse très nette des sucres tributaires de l'invertine, l'action du chloroforme semble ici surtout porter sur l'activité hydrolysante de l'invertine. Cette hydrolyse est plus marquée qu'avec les feuilles d'*Aucuba*.

Les poudres fermentaires (surtout celle obtenue après 4 heures de chloroforme en vapeur saturante) se sont montrées plus actives que la poudre témoin vis-à-vis du saccharose.

Action prolongée du chloroforme à faible dose :

Voyons maintenant l'effet d'une atmosphère contenant 1 p. 1000 de chloroforme :

TABLEAU XXI. — *Action du chloroforme à faible dose sur les feuilles de Laurier-cerise.*

	Témoin 6 heures	CHCl ³ 6 heures	Témoin 48 heures	CHCl ³ 48 heures	Témoin 4 jours	CHCl ³ 4 jours
<i>Déviation :</i>						
Avant invertine	+ 4'	— 3°14'	— 1°24'	— 2°20'	— 2°	— 2°32'
Après invertine	— 2°	— 3°40'	— 2°20'	— 2°32'	— 2°28'	— 2°40'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	373	2.282	550	1.953	494	1.684
Après invertine	1.571	2.353	907	1.984	732	1.684
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation.	2°4'	26'	56'	12'	28'	8'
Sucre réducteur formé.	1.198	71	357	31	238	0

On remarque la rapide diminution des holosides dans les feuilles témoins.

Examinons maintenant les variations des sucres dédoublables par l'invertine sous l'influence d'air contenant 1 p. 1000 de chloroforme.

Au bout de 6 heures : diminution de 94 p. 100 par rapport au témoin.

Au bout de 48 heures : 91 p. 100.

Au bout de 4 jours : hydrolyse totale.

Donc au bout de 6 heures l'hydrolyse est déjà quasi totale. Contrairement à ce qui a lieu pour les hétérosides tributaires de l'émulsine, le chloroforme possède une action plus marquée sur l'invertine *in vivo* à faible dose qu'à forte dose.

Les poudres fermentaires sont légèrement plus actives que les poudres témoin.

3° EXPÉRIENCES SUR LA RUE (*Ruta graveolens* L.).

Nous avons employé des feuilles de Rue, toujours par lots de 100 grammes, soumis au chloroforme en vapeur saturante :

TABLEAU XXII. — Action du chloroforme en vapeur saturante sur les feuilles de Rue.

	Témoin 2 heures	Chloro- forme 2 heures	Témoin 4 heures	Chloro- forme 4 heures
<i>Déviation :</i>				
Avant invertine	+ 1°24'	+ 1°	+ 1°10'	± 0
Après invertine	+ 1°	+ 40'	+ 30'	— 20'
<i>Sucre réducteur :</i>				
Avant invertine ..	837	995	1.302	1.452
Après invertine.....	1.615	1.735	2.102	2.025
<i>Action de l'invertine :</i>				
Recul de la dérivation...	24'	20'	40'	20'
Sucre réducteur formé...	778	740	800	573
Date de l'expérience	Octobre		Juillet	

Les holosides diminuent de 4 p. 100 au bout de deux heures et de 28 p. 100 au bout de 4 heures. Le phénomène est de même ordre (mais beaucoup moins marqué) qu'avec les feuilles de Laurier-cerise.

Cette activité moindre pourrait peut-être s'expliquer par une moins bonne pénétration de l'anesthésique.

4° EXPÉRIENCE SUR LA GAULTHERIE (*Gaultheria procumbens* L.).

Nous avons fait une expérience avec les feuilles sèches de Gaulthérie : Au bout de deux heures de chloroforme en vapeur saturante, il y avait une diminution de 15 p. 100 des holosides dédoublables par l'invertine.

5° EXPÉRIENCE SUR LA BANANE (*Musa sapientum* L.).

Nous avons également fait quelques expériences avec des bananes dont nous parlerons plus longuement lors de l'étude de l'amylase.

Voici les résultats obtenus avec la pulpe.

TABLEAU XXIII. — Action du chloroforme en vapeur saturante sur la Banane.

	Témoin 1 heure	CHCl ³ 1 heure vap. sat.	Témoin 3 heures	CHCl ³ 3 heures vap. sat.	Témoin 2 jours	CHCl ³ au 1/1000 2 jours
<i>Déviation :</i>						
Avant invertine	+ 9°	+ 9°20'	+ 9°6'	+ 7°4'	+ 8°48'	— 4'
Après invertine	— 2°30'	— 2°14'	— 2°40'	— 2°40'	— 1°54'	— 1°28'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	1.320	1.221	1.364	1.875	1.540	4.772
Après invertine	6.728	6.607	6.775	6.552	6.954	5.438
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation..	11°30'	11°34'	11°46'	9°44'	10°42'	1°24'
Sucre réducteur formé	5.408	5.386	5.411	4.677	5.414	666

Variations des holosides sous l'influence du chloroforme.

1 heure vapeur saturante : pas de changement.

3 heures vapeur saturante : *diminution* de 13 p. 100.

2 jours dans une atmosphère contenant 1 p. 1.000 de chloroforme : *diminution* de 87 p. 100.

Essais des produits fermentaires. — En raison de la difficulté d'obtenir des poudres fermentaires, nous avons fait macérer les peaux dans de l'eau toluénée pendant 10 jours. Nous avons

essayé l'activité diastasique des liquides obtenus (1) sur une solution de saccharose à 2 p. 100. Les macérés provenant des lots chloroformés étaient plus actifs que les liquides fermentaires témoins

Action de l'éther sur l'invertine *in vivo*.

Nos expériences ont porté sur les feuilles d'Aucuba, de Rue, sur la Banane et surtout sur les feuilles de Laurier-cerise.

1° FEUILLES D'*Aucuba* (2).

On a procédé comme d'habitude sur des lots de 100 grammes. Les feuilles destinées à être traitées étaient disposées dans une cloche où l'on faisait, à l'aide d'une trompe à eau, un vide de quelques millimètres de mercure, puis on faisait arriver l'éther en excès de façon à être en vapeur saturante. Les feuilles ainsi traitées noircissaient rapidement.

Les lots témoins étaient placés dans des cloches identiques. On a également fait des expériences avec une atmosphère contenant 1 p. 1.000 d'éther. On stabilisait au bout d'un temps déterminé et en même temps les lots étherés et les lots témoins. Les feuilles étaient épuisées à l'alcool, les liqueurs alcooliques concentrées en extrait sec qui était repris en plusieurs fois par 100 cm³ d'eau bouillante. C'est sur cette liqueur aqueuse qu'était pratiquée la méthode biochimique.

Rappelons que, dans le cas de l'*Aucuba* et malgré l'élimination de l'aucubigénol (par filtration après chauffage au bain-marie bouillant), défécation, filtration en présence de noir animal, les liqueurs restent quelquefois colorées et rendent l'examen polarimétrique assez difficile.

Les résultats obtenus avec l'éther en vapeur saturante et en atmosphère au 1 p. 1.000 sont consignés dans les tableaux suivants :

(1) En tenant compte bien entendu du pouvoir réducteur et du pouvoir rotatoire de ces liqueurs.

(2) L'action de l'éther sur les feuilles d'*Aucuba* ayant déjà été étudiée par MASCRÉ et POUSSET [155] nos expériences sur cette plante sont assez peu nombreuses.

TABLEAU XXIV. — Action de l'éther sur les feuilles d'Aucuba.

	Témoin 1 heure	Ether 1 heure vap. sat.	Témoin 2 heures	Ether 2 heures vap. sat.	Témoin 4 jours	Ether au 1/1000 4 jours
<i>Déviation :</i>						
Avant invertine	— 10°	— 8°40'	— 10°20'	— 12°	— 10°20'	+ 2° 8'
Après invertine	— 11°46'	— 10°40'	— 12°12'	— 10°20'	— 12°16'	+ 1°20'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	950	1.116	1.191	1.428	1.000	3.442
Après invertine	2.221	2.521	2.467	2.577	2.221	3.761
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation	1°46'	2°	1°52'	1°40'	1°56'	48'
S. R. formé	1.271	1.405	1.276	1.149	1.221	319
Date de l'expérience.	Mars		Mars		Février	

1° Au bout d'une heure, il y a *augmentation* des holosides dédoublables par l'invertine ; elle est de 10 p. 100 par rapport au témoin.

2° Au bout de deux heures, il y a au contraire *diminution* de 9 p. 100 par rapport au témoin. (Nous avons déjà constaté le même phénomène avec le chloroforme).

3° Les faibles doses (1 p. 1000) en contact prolongé (4 jours) provoquent une hydrolyse marquée (73 p. 100).

Quant aux poudres fermentaires leur activité vis-à-vis du saccharose était de même ordre que celle des poudres témoins.

2° EXPÉRIENCES AVEC LES FEUILLES DE LAURIER-CERISE.

Ces résultats étant acquis, il était intéressant de les comparer à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec les feuilles de Laurier-cerise :

TABEAU XXV. — Action de l'éther sur les feuilles de Laurier-cerise.

	Témoin 1 heure	Ether 1 heure vap. sat.	Témoin 2 heures	Ether 2 heures vap. sat.	Témoin 4 heures	Ether 4 heures vap. sat.	Témoin 4 jours	Ether au 1/1000 4 jours
<i>Déviatiou :</i>								
Avant invertine	+ 28'	+ 6'	— 1°	— 2°40'	+ 46'	— 2°	— 56'	— 3°28'
Après invertine	— 1°	— 1°48'	— 2°16'	— 3°20'	— 1°52'	— 2°4'	— 2°24'	— 3°28'
<i>Sucre réducteur :</i>								
Avant invertine	886	907	705	4.482	920	1.769	360	780
Après invertine	2.082	2.282	1.693	4.731	1.292	1.769	816	780
<i>Action de l'invertine :</i>								
Recul de la déviation	1°28'	1°54'	1°16'	40'	2°8'	4'	1°28'	0
Sucre réducteur formé	1.196	1.375	988	249	372	0	456	0
Date de l'expérience	Février				Novembre			

Variations des holosides dédoublables par l'invertine sous l'influence de l'éther :

1 heure en vapeur saturante : augmentation par rapport au témoin = + 14 p. 100.

2 heures en vapeur saturante : diminution par rapport au témoin = — 74 p. 100.

4 heures en vapeur saturante : hydrolyse totale.

4 jours dans une atmosphère au 1/1.000 : hydrolyse totale.

Les phénomènes observés sont de même sens que ceux constatés avec les feuilles d'*Aucuba* ; c'est-à-dire que sous l'influence de l'éther en vapeur saturante, il y a d'abord prédominance de l'action synthétisante, puis de l'action hydrolysante — ici plus marquée que dans le cas de l'*Aucuba* — (l'hydrolyse atteint 74 p. 100 en deux heures, au lieu de 9 p. 100).

Peut-être est-ce une question de pénétration de l'anesthésique, les feuilles d'*Aucuba* ayant un épiderme plus épais que celui du Laurier-cerise.

Les poudres fermentaires, dont on a mesuré l'activité par rapport à une solution de saccharose à deux pour cent, étaient plus actives que les poudres témoin.

3° EXPÉRIENCES AVEC LES FEUILLES DE RUE.

Nous avons également fait une expérience sur les feuilles de Rue.

TABLEAU XXVI. — *Action de l'éther en vapeur saturante sur les feuilles de Rue.*

	Témoin 4 heures	Ether 4 heures
<i>Déviation :</i>		
Avant invertine	+ 1°10'	+ 50'
Après invertine	+ 30'	+ 20'
<i>Sucre réducteur :</i>		
Avant invertine	1.302	1.502
Après invertine	2.102	2.130
<i>Action de l'invertine :</i>		
Recul de la déviation	40'	30'
Sucre réducteur formé.....	800	628

Dans ce cas aussi, et au bout de 4 heures, il y a hydrolyse des sucres (20 p. 100) dédoublables par l'invertine.

4° EXPÉRIENCES SUR LA BANANE.

Résultats obtenus avec la pulpe :

TABEAU XXVII. — *Action de l'éther sur la Banane.*

	Témoin 1 heure	Ether 1 heure vap. sat.	Témoin 3 heures	Ether 3 heures vap. sat.	Témoin 2 jours	Ether au 1/1000 2 jours
<i>Déviatiou :</i>						
Avant invertine	+ 9°	+ 9° 4'	+ 9° 6'	+ 9° 6'	+ 8° 48'	+ 5° 12'
Après invertine	— 2° 30'	— 2° 14'	— 2° 40'	+ 3° 30'	— 1° 52'	— 2° 8'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	1.320	1.100	1.364	1.457	1.540	2.047
Après invertine	6.728	5.665	6.775	7.775	6.954	5.633
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation	11° 30'	11° 28'	11° 46'	12° 36'	10° 40'	7° 20'
S. R. formé	5.408	4.565	5.411	6.318	5.414	3.536

Variations des holosides sous l'influence de l'éther.

Après 1 heure de vapeur saturante : *diminution* de 15 p. 100.

Après 3 heures de vapeur saturante : *augmentation* de 16 p. 100.

Après 2 jours dans une atmosphère au 1/1.000 : *diminution* de 33 p. 100.

Remarquons que, dans ce cas, il y a d'abord eu diminution puis augmentation, enfin une nouvelle diminution des holosides tributaires de l'invertine alors que généralement on constate, sous l'influence des vapeurs anesthésiques, d'abord une augmentation puis une diminution de ces mêmes holosides.

Nous avons apprécié l'activité de la sucrase après action de l'éther en faisant macérer les peaux dans de l'eau toluénée pendant 10 jours. Nous avons fait agir ces macérés sur une solution de saccharose. Avec les macérés « éthérés » nous avons obtenu une hydrolyse un peu plus rapide du saccharose.

Action du formol sur l'invertine *in vivo*.

TRAVAUX ANTÉRIEURS.

L'action des vapeurs d'aldéhyde formique sur les végétaux a été étudiée par BOKORNY [17], lors de ses belles recherches sur la formation des glucides.

Considérant l'aldéhyde formique comme toxique, BOKORNY opérait avec de l'oxyméthylsulfonate de sodium qui, au contact d'eau et de phosphate disodique dégage peu à peu l'aldéhyde formique et il a montré que, dans ces conditions, en l'absence de gaz carbonique, il y avait formation d'amidon chez certaines algues.

Dans d'autres expériences sur le Haricot, BOKORNY procède en atmosphère contenant jusqu'à 1,3 p. 100 d'aldéhyde formique et constate qu'il y a accumulation de glucides dans les feuilles.

Il conclut, de ses diverses expériences, que les plantes vertes sont capables d'assimiler l'aldéhyde formique et de le transformer en glucides.

Nous nous sommes placé à un autre point de vue puisque nous avons envisagé l'action du formol sur l'invertine *in vivo* et nous avons été amené à étudier ce corps parce que le formol passe pour un inhibiteur des diastases. Nous avons déjà vérifié ce fait *in vivo* et *in vitro* pour l'émulsine. Le même phénomène a-t-il lieu pour l'invertine ?

Son action est-elle différente de celles du chloroforme ou de l'éther ? C'est ce que nous nous sommes proposé de vérifier.

La matière d'étude et les techniques ont été les mêmes que précédemment.

1° EXPÉRIENCES AVEC LES FEUILLES D'*Aucuba*.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU XXVIII. — Action du formol sur les feuilles d'Aucuba.

	Témoin 1 heure	Formol 1 heure en vap. sat.	Témoin 3 heures	Formol 3 heures en vap. sat.	Témoin 4 jours	Formol à 1 p. 1000 4 jours
<i>Déviatiou :</i>						
Avant invertine	— 8°16'	— 9°	— 9°6'	— 8°8'	— 10°20'	— 6°
Après invertine	— 9°28'	— 10°20'	— 10°40'	— 10°8'	— 12°16'	— 7°40'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	340	450	247	340	1.000	1.720
Après invertine	1.592	2.063	1.743	2.197	2.221	2.821
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation	1°12'	1°20'	1°34'	2°	1°56'	1°40'
S. R. formé	1.252	1.613	1.496	1.857	1.221	1.101
Date de l'expérience.	Mars		Avril		Février	

Variations des holosides dédoublables par l'invertine :

1 heure en vapeur saturante : *augmentation* par rapport au témoin = + 28 p. 100.

2 heures en vapeur saturante : *augmentation* par rapport au témoin = + 24 p. 100.

4 jours en atmosphère à 1 p. 1.000 : *diminution* de 9 p. 100.

Le formol provoque donc, comme le chloroforme et l'éther, une augmentation des holosides, tout au moins en vapeur saturante et pour des expériences de courte durée ; à faible dose et par action prolongée, on a, au contraire, une hydrolyse d'holosides. L'activité des poudres fermentaires, au point de vue sucrase, était identique à celle des témoins.

L'action des vapeurs de formol ne semble donc pas être la même que dans le cas de l'émulsine *in vivo*. Elles agissent comme stimulant, et non comme inhibiteur, dans le cas de l'invertine.

2° EXPÉRIENCES AVEC LES FEUILLES DE LAURIER-CERISE.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABEAU XXIX. — *Action du formol en vapeur saturante sur les feuilles de Laurier-cerise.*

	Témoin 1 heure	Formol 1 heure	Témoin 2 heures	Formol 2 heures	Témoin 4 heures	Formol 4 heures
<i>Déviatiou :</i>						
Avant invertine	+ 28'	+ 32'	+ 12'	+ 32'	+ 18'	± 0
Après invertine	— 1°	— 1°40'	— 1°	— 1°28'	— 1°50'	— 2°
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	886	1.008	926	1.048	920	840
Après invertine	2.082	2.240	1.899	2.040	1.292	1.056
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation	1°28'	2°12'	1°12'	2°	2°8'	2°
S. R. formé.....	1.196	1.232	973	992	372	216
Date de l'expérience.	Mars		Mars		Novembre	

TABEAU XXX. — *Action du formol sur les feuilles de Laurier-cerise en atmosphère au 1/1.000.*

	Témoin 24 heures	Formol 24 heures	Témoin 4 jours	Formol 4 jours
<i>Déviatiou :</i>				
Avant invertine	— 1°	— 48'	— 56'	— 2°46'
Après invertine	— 2°16'	— 2°	— 2°24'	— 2°48'
<i>Sucre réducteur :</i>				
Avant invertine	705	926	360	720
Après invertine	1.693	1.486	816	720
<i>Action de l'invertine :</i>				
Recul de la déviation....	1°16'	1°12'	1°28'	2'
Sucre réducteur formé...	988	560	456	0
Date de l'expérience.....	Janvier		Novembre	

Variations des holosides sous l'influence du chloroforme :

1 heure de vapeur saturante : augmentation de 11 p. 100 par rapport au témoin.

2 heures de vapeur saturante : pas de changement sensible (1).

4 heures de vapeur saturante : diminution de 42 p. 100 par rapport au témoin.

24 heures d'atmosphère à 1 p. 1.000 : diminution de 43 p. 100 par rapport au témoin.

4 jours d'atmosphère à 1 p. 1.000 : hydrolyse totale.

L'action est comparable à celle exercée sur les feuilles d'*Aucuba*. Notons, cependant, quelques petites différences de détail : en vapeur saturante et pour des expériences de courte durée, l'augmentation existe, mais elle est moins forte ; par contre, en atmosphère contenant 1 p. 1.000 de formol, la diminution est plus marquée ; il y a ici hydrolyse des holosides.

Dans ces expériences, le formol ne semble pas inhiber l'invertine *in vivo*, comme il le faisait pour l'émulsine. Il se comporte comme le chloroforme et l'éther. Il y aurait activation de l'action synthétisante et de l'action hydrolysante de la sucrase sur les holosides.

Quant aux poudres fermentaires correspondantes, elles étaient « activées », c'est-à-dire qu'elles hydrolysaient plus rapidement le saccharose que les poudres témoin. Voici d'ailleurs les résultats obtenus :

Saccharose à 2 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviatiou	Initiale	Après 1 jour	Après 3 jours
—	—	—	—
Laurier cerise témoin.....	+ 2°32'	+ 44'	— 30'
Laurier cerise après 1 heure de formol en vapeur saturante.....	+ 2°32'	+ 42'	— 42'
Laurier cerise après 2 heures de formol en vapeur saturante.....	+ 2°32'	+ 38'	— 50'
Laurier cerise après 4 heures de formol en vapeur saturante.....	+ 2°32'	+ 40'	— 50'
Laurier cerise après 4 jours de formol à 1 p. 1000.....	+ 2°32'	+ 42'	— 40'

(1) L'augmentation de 2 p. 100 est de l'ordre des erreurs d'expériences.

3° EXPÉRIENCES SUR LA BANANE.

TABLEAU XXXI. — Action du formol sur la Banane.

	Témoin 1 heure	Formol 1 heure vap. sat.	Témoin 3 heures	Formol 3 heures vap. sat.	Témoin 2 jours	Formol au 1/1000 2 jours
<i>Déviation :</i>						
Avant invertine	+ 9°	+ 9°54'	+ 9°6'	+ 9°50'	+ 8°48'	+ 8°
Après invertine	— 2°30'	— 2°24'	— 2°40'	— 2°40'	— 1°52'	— 2°8'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	1.320	990	1.364	1.457	1.540	1.960
Après invertine	6.728	6.567	6.775	7.775	6.954	6.906
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation.	11°30'	12°18'	11°46'	12°30'	10°40'	10°8'
S. R. formé	5.408	5.577	5.411	6.318	5.414	4.946

Variations des holosides sous l'influence du formol :

Après 1 heure de vapeur saturante : *augmentation* de 3 p. 100 (par rapport au témoin).

Après 3 heures de vapeur saturante : *augmentation* de 16 p. 100.

Après 2 jours dans une atmosphère au 1/1.000 : *diminution* de 8 p. 100.

Les liquides fermentaires obtenus par macération des peaux (ainsi que nous l'avons déjà indiqué à propos du chloroforme et de l'éther) étaient d'activité identique à celle des témoins.

Action de l'acroléine sur l'invertine *in vivo*.

Nous avons employé de l'aldéhyde acrylique stabilisé par 0,50 pour 100 d'hydroquinone.

L'acroléine s'étant montrée, même à faible dose, un inhibiteur de l'émulsine, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, il était intéressant de voir son action sur l'invertine *in vivo*.

Afin que nos expériences soient comparables aux précédentes, nous avons opéré sur les mêmes végétaux et dans les mêmes conditions,

TABLEAU XXXII. — *Action de l'acroléine sur les feuilles d'Aucuba.*

	Témoin 1 heure	Acroléine 1 heure de vapeur saturante	Témoin 3 heures	Acroléine 3 heures de vapeur saturante	Témoin 4 jours	Acroléine à 1 p. 100 4 jours
<i>Déviation :</i>						
Avant invertine	— 8°16'	— 9°20'	— 9° 6'	— 9°24'	— 10°20'	+ 3°40'
Après invertine	— 9°28'	— 10°48'	— 10°40'	— 11°12'	— 12°16'	+ 2°
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine.....	340	247	247	120	1.000	1.926
Après invertine	1.592	1.848	1.743	2.080	2.221	2.966
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation	1°12'	1°28'	1°34'	1°48'	1°56'	1°40'
S. R. formé.....	1.252	1.601	1.496	1.960	1.221	1.040
Date de l'expérience.	Mars		Mars		Février	

Variations des holosides :

1 heure de vapeur saturante : *augmentation* de 27 p. 100 par rapport au témoin.

3 heures de vapeur saturante : *augmentation* de 31 p. 100 par rapport au témoin.

4 jours d'atmosphère au 1/1.000 : *diminution* de 14 p. 100.

Les résultats sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus avec le formol. Les poudres fermentaires (surtout celle qui avait été obtenue après action de l'acroléine pendant 3 heures) essayées sur une solution de saccharose étaient nettement atténuées par rapport au témoin, ainsi que le montrent les résultats suivants :

Saccharose à 2 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire.

Déviation	Initiale	Après 5 jours	Après 10 jours
—	—	—	—
Aucuba témoin	+ 2°32'	+ 1°40'	+ 24'
Aucuba 1 heure acroléine	+ 2°32'	+ 2°28'	+ 22'
Aucuba 3 heures acroléine	+ 2°32'	+ 2°28'	+ 2°

TABLEAU XXXIII. — Action de l'acroléine sur les feuilles de Laurier-cerise : a) en vapeur saturante.

	Témoin 1 heure	Acroléine 1 heure	Témoin 2 heures	Acroléine 2 heures	Témoin 4 heures	Acroléine 4 heures
<i>Déviatiou :</i>						
Avant invertine	— 40'	+ 40'	— 1°	— 1°32'	+ 16'	— 40'
Après invertine	— 2°40'	1°	— 2°46'	— 2°52'	— 1°52'	— 2°
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	900	900	705	1,008	920	1,462
Après invertine	1,852	1,883	1,693	1,995	1,292	1,252
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation . .	1°30'	1°40'	1°46'	1°20'	2°8'	1°20'
S. R. formé	952	983	988	987	372	90
Date de l'expérience . .	Janvier		Janvier		Janvier	

TABLEAU XXXIV. — Action de l'acroléine sur les feuilles de Laurier-cerise : b) en atmosphère au 1/1.000.

	Témoin 3 jours	Acroléine 3 jours	Témoin 4 jours	Acroléine 4 jours
<i>Déviatiou :</i>				
Avant invertine	— 40'	— 2°24'	— 56'	— 2°
Après invertine	— 1°52'	— 2°24'	— 2°24'	— 2°
<i>Sucre réducteur :</i>				
Avant invertine	1,080	2,218	360	1,630
Après invertine	1,572	1,572	816	1,642
<i>Action de l'invertine :</i>				
Recul de la déviation . .	1°12'	0	1°28'	0
Sucre réducteur formé . .	492	0	456	12
Date de l'expérience . .	Février		Novembre	

Variations des holosides :

1 heure de vapeur saturante : augmentation de 3 p. 100 par rapport au témoin.

2 heures de vapeur saturante : pas de variation.

4 heures de vapeur saturante : diminution de 75 p. 100 par rapport au témoin.

3 ou 4 jours (atmosphère au 1/1.000) : hydrolyse totale.

Après une légère augmentation, il y a une diminution marquée ; dans le cas de l'invertine, il n'y a donc pas inhibition des actions diastasiques par l'acroléine. Cependant les poudres fermentaires obtenues après action de l'acroléine hydrolysent moins rapidement le saccharose que les poudres témoins.

TABLEAU XXXV. — Action de l'acroléine sur la Banane.

	Témoin 1 heure	Acroléine 1 heure vap. sat.	Témoin 3 heures	Acroléine 3 heures vap. sat.	Témoin 2 jours	Acroléine au 1/1000 2 jours
<i>Déviation :</i>						
Avant invertine	+ 9°	+ 9°10'	+ 9°6'	+ 7°40'	+ 8°48'	+ 2°32'
Après invertine	— 2°30'	— 1°40'	— 2°40'	— 2°8'	— 1°52'	— 2°4'
<i>Sucre réducteur :</i>						
Avant invertine	1.320	1.221	1.364	1.993	1.540	3.524
Après invertine	6.728	6.023	6.775	6.670	6.954	5.678
<i>Action de l'invertine :</i>						
Recul de la déviation.	11°30'	10°50'	11°46'	9°48'	10°40'	4°36'
S. R. formé.	5.408	4.802	5.411	4.677	5.414	2.154

Variation des holosides sous l'influence de l'acroléine.

Après 1 heure de vapeur saturante = diminution de 11 p. 100 (par rapport au témoin).

Après 3 heures de vapeur saturante = diminution de 13 p. 100.

Après 2 jours en atmosphère au 1/1.000 = diminution de 60 p. 100.

Les liquides fermentaires, obtenus par macération des peaux pendant 10 jours dans de l'eau toluénée, se sont montrés moins actifs que le témoin vis-à-vis du saccharose, ainsi qu'en témoignent les résultats suivants (on a tenu compte de la déviation propre des liquides fermentaires).

Saccharose à 2 p. 100 + 10 p. 100 de liquide fermentaire.

Déviations	Initiale	Après 10 jours
Liquide témoin.....	+ 2°32'	— 36'
Liquide après 1 heure d'acroléine.....	+ 2°32'	+ 1°4'
Liquide après 3 heures d'acroléine.....	+ 2°32'	+ 1°56'

CONCLUSIONS.

1. En résumé *sous l'influence des vapeurs de chloroforme* nous avons constaté, à l'aide de la méthode biochimique, chez le *Laurier-cerise* une diminution des holosides atteignant 20 p. 100 en 1 heure, et 60 p. 100 après 3 heures de vapeur saturante ; en atmosphère au 1/1.000, après 4 jours, il y a hydrolyse totale.

Chez l'*Aucuba* il y a augmentation (+ 8 p. 100) des holosides au bout d'une heure de vapeur saturante, tandis qu'il y a une forte hydrolyse (87 p. 100) avec de faibles doses (1 p. 1000) après 4 jours.

Chez la *Rue*, il y a une hydrolyse de 4 p. 100 en deux heures et de 28 p. 100 en 4 heures de vapeur saturante.

Chez la *Gaulthérie* elle est de 15 p. 100 en deux heures.

Enfin chez la *Banane* nous avons constaté qu'il n'y avait pas de changement de la quantité des holosides tributaires de l'invertine après 1 heure, et une diminution de 13 p. 100 après 3 heures en vapeur saturante ; l'hydrolyse est encore plus marquée à faible dose (1/1.000) et par action prolongée (2 jours) dans ces conditions, il y a une diminution de 87 p. 100 par rapport au témoin. Quant aux produits fermentaires obtenus après action du chloroforme et essayés sur une solution de saccharose, ils se sont montrés en général plus actifs que les témoins.

2. *Sous l'influence des vapeurs d'éther, chez le Laurier-cerise* après 1 heure de vapeur saturante il y a augmentation (+ 14 p. 100) des holosides puis diminution (— 74 p. 100) après 2 heures dans les mêmes conditions. L'hydrolyse est totale avec de faibles doses (1/1.000) et par contact prolongé (4 jours).

Chez les feuilles d'*Aucuba* les faits constatés sont de même ordre : augmentation de 10 p. 100 après 1 heure, diminution

de 9 p. 100 après 1 heure de vapeur saturante et également diminution de 73 p. 100 après 4 jours dans une atmosphère contenant 1/1.000 d'éther.

En ce qui concerne la *Banane*, on constate d'abord une diminution (— 15 p. 100) puis une augmentation (+ 16 p. 100) après 1 heure et 3 heures de vapeur saturante ; tandis qu'il y a une hydrolyse de 33 p. 100 après deux jours à faible dose (au 1/1.000). Comme dans le cas du chloroforme les produits fermentaires « éthérés » sont généralement plus actifs que les témoins.

3. *Sous l'influence des vapeurs de formol*, dans le cas des feuilles d'*Aucuba*, il y a une augmentation très nette des holosides (de 28 p. 100 en 1 heure et de 24 p. 100 en 3 heures) avec le formol en vapeur saturante ; à faible dose et par contact prolongé, on constate au contraire une légère hydrolyse (— 9 p. 100).

Chez le *Laurier-cerise*, les phénomènes observés sont de même ordre, mais moins marqués : en vapeur saturante il y a d'abord augmentation (de 11 p. 100) en 1 heure, pas de changement en deux heures, puis diminution (42 p. 100) en 4 heures.

Chez la *Banane*, en vapeur saturante, on constate également une augmentation au bout d'une heure (+ 3 p. 100) et de 3 heures (+ 16 p. 100) ; par contre, à faible dose, on constate une hydrolyse (— 8 p. 100) au bout de deux jours. Quant aux produits fermentaires ils sont d'activité égale, quelquefois supérieure, à celle des témoins.

4. Il nous reste à étudier l'action des vapeurs d'acroléine, les variations observées dans ce cas sont de même sens que celles provoquées par le formol.

Chez l'*Aucuba* il y a augmentation des holosides atteignant 27 p. 100 en une heure et 31 p. 100 en 3 heures de vapeur saturante, tandis qu'à faible dose il y a hydrolyse (— 14 p. 100) en 4 jours.

Chez le *Laurier-cerise* à forte dose (vapeur saturante) il y a d'abord augmentation (atteignant 3 p. 100 en 1 heure) puis pas de changement après deux heures, et enfin une hydrolyse atteignant 75 p. 100 des holosides après 4 heures.

A faible dose (1/1.000) l'hydrolyse est totale après 4 jours.

Enfin chez la *Banane*, aussi bien à forte dose qu'à faible dose, nous avons toujours constaté une diminution des holo-

sides, en vapeur saturante, celle-ci atteint 11 p. 100 après 1 heure et 13 p. 100 en heures ; en atmosphère au 1/1.000 et, après 2 jours, elle est beaucoup plus prononcée et atteint 60 p. 100.

Les produits fermentaires sont d'activité inférieure à celle des témoins ; l'atténuation est d'autant plus nette que l'action de l'acroléine a été plus prolongée.

Comme dans le cas des hétérosides tributaires de l'émulsine on constate donc avec l'invertine *in vivo* et sous l'influence des corps organiques volatils non seulement une hydrolyse mais aussi, dans certaines conditions, une synthèse d'holosides tributaires de l'invertine.

Remarquons de plus que, contrairement à ce qui se passe pour l'émulsine, le formol et l'acroléine agissent, même à forte dose, comme le chloroforme et l'éther.

Nous discuterons de ces différents phénomènes quand nous aurons étudié l'action de ces mêmes substances sur l'invertine *in vitro*.

B. — Etude de l'invertine (ou sucrase) « in vitro ».

Généralités. — Après avoir envisagé l'action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine, *in vivo*, nous avons étudié l'action de ces mêmes substances organiques sur l'invertine *in vitro*.

Notre étude a porté sur des invertines de préparation et d'origine différentes. A propos de la sucrase de levure, nous avons été amené à faire intervenir les substances envisagées au cours de la préparation et à les faire agir sur les cellules de levure.

Comme sources d'invertine, nous avons utilisé la levure de boulangerie et l'*Aspergillus niger*.

A partir de la levure, nous avons préparé des extraits fermentaires selon la méthode de BOURQUELOT [28] ou des autolysats suivant la méthode de COLIN [70]. Avec l'*Aspergillus*, nous avons obtenu des poudres fermentaires et des liquides fermentaires. Dans l'étude de chacune des substances chimiques, nous envisagerons d'abord l'action au cours de la préparation et nous essayerons l'activité des produits ainsi obtenus vis-à-vis du saccharose ; puis nous étudierons l'influence de ces mêmes substances sur l'action hydrolysante de l'invertine. Dans le cas d'inhibition, nous tâcherons de déterminer le mécanisme de cette inhibition ; mais auparavant, nous dirons quelques mots de la *préparation des différentes invertines*.

Pour l'*invertine de levure*, la matière première employée était de la levure haute pressée dite « des boulangers » genre Springer. Nous avons toujours utilisé des produits très frais afin d'avoir des produits identiques à eux-mêmes et exempts

de ferments étrangers [38]. Pour la préparation nous avons suivi le mode opératoire indiqué par BOURQUELOT [28].

La levure fraîche est soigneusement délayée dans huit fois son poids d'alcool à 95°. On laisse 24 heures. Onessore sur un filtre de Büchner, on lave à l'alcool puis à l'éther. On sèche dans le vide sulfurique : le rendement est d'environ 28 grammes pour 100 grammes de levure fraîche.

Comme autre source de sucrase, nous avons utilisé également des autolysats préparés suivant la méthode de COLIN [70].

On abandonne à la putréfaction de la levure délayée dans deux fois son poids d'eau distillée. Après quelques jours, on filtre sur entonnoir de Büchner et on conserve sous toluène.

Nous avons également préparé une invertine purifiée, selon la méthode d'EULER et SVANBERG [92], en ajoutant à l'autolysat quatre fois son volume d'alcool à 95°, le précipité est recueilli et séché dans le vide sulfurique : 500 cm³ d'autolysat provenant de 250 grammes de levure nous ont donné 0 g.,40 d'invertine purifiée.

Pour ce qui est de l'*Aspergillus niger*, nous avons employé la poudre et le liquide fermentaires dont nous avons déjà décrit la préparation à propos de l'émulsine.

Action du chloroforme sur l'invertine *in vitro*.

Nous avons fait intervenir le chloroforme au cours de la préparation de l'invertine à partir de la levure (1). 250 grammes de levure SPRINGER sont soumis pendant 24 heures aux vapeurs saturantes de chloroforme ; il se produit rapidement une liquéfaction de la masse due à la plasmolyse et à l'exolyse provoquées par les vapeurs de chloroforme.

On ajoute alors 8 volumes d'alcool à 90° afin d'obtenir un extrait fermentaire suivant la méthode de BOURQUELOT. On laisse déposer 24 heures, on filtre ; on lave à l'alcool, puis à l'éther, enfin on sèche dans le vide sulfurique. Le rendement est de 6 g.,50 d'extrait fermentaire, (tandis que le témoin donne 7 g.,

(1) A propos de cette action du chloroforme sur la levure (action qui peut être considérée comme une expérience sur la sucrase *in vivo*) rappelons ici les travaux de NADSON et WEISS [162] qui étudièrent, au point de vue cytologique, l'action du chloroforme sur la cellule de levure et montrèrent l'existence de deux phases l'une réversible (excitation du protoplasme, diminution de la perméabilité) l'autre irréversible (coagulation du protoplasme). Au point de vue chimique, lors de notre étude de la sucrase *in vivo*, nous avons trouvé aussi l'existence de deux phases,

le produit chloroformé essayé sur le saccharose à 2 p. 100 s'est montré légèrement plus actif).

Dans une autre expérience, nous avons fait agir le chloroforme en vapeur saturante sur de la levure SPRINGER délayée dans son poids d'eau.

Au bout de deux heures, nous avons filtré sur entonnoir de Büchner ; on recueille ainsi 120 cm³ de filtrat (alors que le témoin n'en donne que 85) mais cet exolysat s'est montré peu actif sur le saccharose ; il est néanmoins plus actif que le liquide témoin.

Nous avons préparé un autre exolysat fermentaire en faisant agir pendant 4 heures les vapeurs de chloroforme sur 100 grammes de levure délayée dans 50 cm³ d'eau. On sort la levure de la cloche, on ajoute 100 cm³ d'eau distillée et on filtre au Büchner ; on obtient ainsi 160 cm³ de liquide, mais qui est toujours peu actif (le témoin ne donne que 120 cm³ de produit).

Nous avons mesuré colorimétriquement le pH du liquide obtenu ; il était égal à 4,8 par conséquent à peu près identique à celui du témoin (pH = 4,6). Enfin, nous avons fait intervenir, non plus les vapeurs de chloroforme, mais le liquide lui-même.

Dans un tube à centrifuger de 50 cm³, on délaye 20 grammes de levure Springer avec 20 cm³ de chloroforme, la masse se liquéfie en quelques minutes ; on laisse une heure en contact ; on centrifuge ; on recueille le liquide aqueux, on remet en suspension plusieurs fois dans 20 cm³ d'eau distillée ; on recueille les liquides aqueux après centrifugation, de façon à obtenir 100 cm³ d'exolysat qu'on conserve sous toluène.

Nous avons procédé de même avec d'autres agents qui sont plasmolysants, non plus par modification de la perméabilité de la membrane cellulaire (comme c'est le cas pour les anesthésiques), mais par différence de pression osmotique (cas des solutions hypertoniques).

On a donc mélangé des lots de 20 grammes de levure avec 20 grammes de saccharose, 20 grammes de sulfate de sodium à 20 p. 100 ou 20 g. de sulfate de sodium anhydre ; on a opéré comme précédemment de façon à obtenir 100 cm³ d'exolysat).

Ces différents exolysats ont été essayés vis-à-vis du saccharose à 2 p. 100.

Saccharose à 2 p. 100 + 10 p. 100 d'exolysat.

Témoin.....	+ 2°32'	+ 22'	± 0	— 40'
Exolysat chloroformique.	+ 2°32'	+ 8'	— 14'	— 40'
Exolysat sulfate de sodium à 20 p. 100	+ 2°32'	+ 24'	+ 4'	— 40'
Exolysat sulfate de sodium anhydre.....	+ 2°32'	— 20'	— 40'	— 40'

L'exolysat obtenu avec le sulfate de sodium anhydre est beaucoup plus actif. En effet, lorsqu'on a ajouté de l'eau, il y a eu cristallisation et le réseau cristallin a fait éclater les cellules de levure. (On obtient d'ailleurs un liquide aussi actif en triturant la levure avec du sable ou de la terre d'Infusoire). Par contre, le sulfate de sodium à 20 p. 100 agissant uniquement par plasmolyse, n'a pas donné d'exolysat sensiblement plus actif que le témoin.

De toutes ces expériences, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° La levure fraîche ne cède que des traces d'invertine à l'eau distillée, fait déjà connu et signalé par de nombreux auteurs (WILLSTAETTER [201], en particulier).

2° Sous l'influence du chloroforme, il y a exolyse et, si l'on reprend par l'eau, on obtient un exolysat relativement actif.

3° Par contre, des solutions hypertoniques et plasmolysantes ne donnent pas des liquides aussi actifs. Il semble donc que, dans le cas du chloroforme, il intervienne autre chose que la plasmolyse et qu'il y ait en même temps dissociation des complexes qui retenaient le ferment.

Cependant, même après action du chloroforme, la levure abandonne peu d'invertine à l'eau distillée. Pour obtenir une solution plus riche il faut en outre déchirer les membranes cellulaires soit en provoquant une cristallisation au sein des cellules, soit en triturant avec un abrasif tel que le sable ou la terre d'infusoires.

Nous avons eu des résultats analogues avec les amandes à propos de l'extraction de l'émulsine. Nous arrivons donc aux mêmes conclusions que GALLIMARD [101] lors de ses recherches sur l'extraction des stérols de la levure et que FABRE et

SIMONNET [94] à propos de l'obtention du glutathion de la levure.

Il existe un autre moyen d'obtenir des solutions de sucrase à partir de la levure, c'est de laisser se produire l'autolyse (COLIN [73]).

On obtient ainsi des autolysats très actifs qui ont été employés par COLIN et ses collaborateurs.

Nous avons préparé quelques autolysats en présence de chloroforme :

125 grammes de levure Springer sont délayés dans 250 cm³ d'eau distillée ; on ajoute quelques gouttes de toluène et on laisse 4 jours dans une cloche contenant du chloroforme. Le témoin est traité dans les mêmes conditions mais sans chloroforme. On filtre au Büchner. On recueille 325 cm³ d'autolysat, tandis que le témoin n'en donne que 250 cm³.

Dans une autre expérience, nous avons soumis à l'autolyse de la levure traitée pendant 24 heures par des vapeurs saturantes de chloroforme. Le liquide obtenu était légèrement plus actif que l'autolysat témoin.

Nous avons également fait agir le chloroforme en vapeur saturante sur l'*Aspergillus niger* — les produits obtenus (liquide fermentaire et mycélium pulvérisé) se sont montrés identiques aux témoins.

Quant à l'action du chloroforme sur l'invertine au cours de l'hydrolyse du saccharose, on sait qu'elle est insignifiante ; c'est ce qui permet d'ajouter du chloroforme comme antiseptique aux solutions de saccharose.

Action de l'éther sur l'invertine *in vitro*.

On sait que l'éther est sans action sensible sur l'activité de la sucrase et que l'hydrolyse du saccharose en présence d'éther n'est nullement retardée.

La sucrase n'est sensible à l'action de l'éther qu'à la température d'ébullition de celui-ci ; encore faut-il au préalable dessécher la levure dans le vide sulfurique pendant 48 heures. Dans ces conditions, si l'on met la levure desséchée dans la cartouche du Soxhlet et qu'on épuise 4 heures à l'éther bouillant, la levure épuisée se montre presque inactive vis-à-vis du saccharose.

Remarquons que, dans les mêmes conditions, la poudre

d'amandes conserve une certaine activité diastasique. L'émulsine d'amandes semble donc plus résistante à l'éther bouillant que l'invertine de levure.

Nous avons donc surtout étudié l'action des vapeurs d'éther au cours de la préparation de l'invertine.

Si l'on soumet de la levure aux vapeurs d'éther, il se produit rapidement une liquéfaction de la masse. Cette levure ainsi traitée pendant 24 heures est additionnée de 8 volumes d'alcool suivant la méthode de BOURQUELOT. Le rendement est sensiblement identique à celui de la levure non soumise au traitement préalable par l'éther. Il en est de même avec les autolysats. L'autolysat « éthéré » n'est pas plus actif que le témoin.

Lors de la liquéfaction, l'invertine ne passe pas dans le liquide, car si l'on filtre sous pression réduite, le filtrat se montre peu actif vis-à-vis du saccharose.

Nous avons repris des expériences analogues, non plus avec les vapeurs d'éther, mais avec le liquide lui-même et nous avons comparé les produits fermentaires éthérés à ceux obtenus avec des solutions plasmolysantes (sulfate de sodium à 20 p. 100) suivant des techniques déjà indiquées au chapitre précédent à propos de l'action du chloroforme sur l'invertine.

Saccharose à 2 p. 100 + 10 p. 100 d'exolysat.

Déviation	Initiale	Après 3 heures	Après 6 heures	Après 20 heures
Témoin.....	2°32'	+ 22'	± 0	— 40'
Exolysat éthéré.....	2°32'	+ 18'	— 4'	— 40'
Exolysat après action du sulfate de soude 20 p. 100.	2°32'	+ 24'	+ 4'	— 40'
Exolysat après action du sulfate de soude anhydre.	2°32'	— 20'	— 40'	— 40'

L'exolysat éthéré est plus actif que le liquide témoin (1) et que l'exolysat après action du sulfate de sodium à 20 p. 100. Il est par contre moins actif que l'exolysat obtenu après action du sulfate de sodium anhydre. C'est que dans ce cas, il

(1) Le liquide témoin contient un peu d'invertine. Cela peut être dû au traumatisme subi par quelques cellules au cours du délayage avec l'eau.

n'y a pas eu seulement plasmolyse, mais cristallisation de SO^*Na^2 10 H_2O au sein des cellules, ce qui a donné lieu à un déchirement des membranes cellulaires.

La plasmolyse préalable par action du sulfate de sodium, à 20 p. 100 ne « libère » pas l'invertine. Si l'exolysat éthéré est un peu plus actif que le liquide témoin, c'est qu'il est intervenu autre chose que la plasmolyse.

Ces expériences sur la sucrase de la levure sont donc en accord avec les faits déjà observés lors de l'étude de l'émulsine *in vivo* et *in vitro*.

Action du formol sur l'invertine.

Cette question a déjà été étudiée par différents auteurs. En 1918, BOKORNY [16] a montré que le formol même à faible dose (0,2 p. 100) retardait la croissance et la fermentation de la levure. Par contre, même à la dose de 1 p. 100, le formol ne rend pas l'invertine inactive alors que la zymase est détruite.

En 1923, EULER et MYRBACH [91] étudient l'action du formol sur la sucrase et rapportent cette inactivation à la formation d'un dérivé méthylénique.

Nous-même, [153] en collaboration avec M. MASCRÉ, avons déjà publié nos expériences préliminaires sur ce mécanisme de l'action inhibitrice du formol sur l'invertine. Depuis lors, la question a été étudiée par Mlle CHAUDUN [65] et par POE, LOVLEY et WITH [175].

Nous reviendrons d'ailleurs sur tous ces travaux lors de nos conclusions.

Nos expériences ont porté sur l'action du formol soit au cours de la préparation de l'invertine, soit au cours de l'hydrolyse du saccharose par ce ferment.

Si l'on soumet de la levure de boulangerie, type Springer, aux vapeurs de formol, la masse ne se liquéfie pas, comme c'est le cas avec l'éther ou le chloroforme, elle devient granuleuse. Cependant, l'invertine ne semble pas altérée. En effet, une levure traitée pendant 24 heures par le formol en vapeur saturante donne un extrait fermentaire (préparé selon la méthode de BOURQUELOT) ou un autolysat (suivant la méthode de H. COLIN) d'activité comparable à celle des témoins.

De plus, cette levure « formolée » ne cède pas son invertine à l'eau ; celle-ci reste accrochée au substrat.

Nous avons complété ces expériences en utilisant l'invertine préparée comme l'invertine type, mais en employant, au lieu d'alcool à 95°, de l'alcool additionné de 10 p. 100 de formol.

Cette invertine a été comparée au ferment type. L'activité était sensiblement égale à celle de l'invertine-type.

Les faits semblent montrer que l'action inhibitrice du formol est moins marquée sur l'invertine que sur l'émulsine. Mais ces expériences doivent être complétées par l'étude de l'action du formol au cours de l'hydrolyse du saccharose par la saccharase.

On fait agir l'invertine (0,10 p. 100) sur une solution de saccharose à 2 p. 100 en présence de 1, 2, 5 et 10 p. 100 de formol (1) et l'on compare la marche de l'hydrolyse à celle d'une expérience témoin.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant :

Saccharose à 2 p. 100 + 0,10 p. 100 d'invertine.

Déviation	Initiale	Après 1 jour	Après 2 jours	Après 7 jours
Témoin.....	+ 2°34'	— 42'	— 40'	— 50'
Formol 1 p. 100.....	+ 2°34'	— 40'	— 40'	— 50'
Formol 2 —.....	+ 2°34'	— 30'	— 36'	— 50'
Formol 5 —.....	+ 2°34'	— 36'	— 38'	— 50'
Formol 10 —.....	+ 2°34'	— 22'	— 36'	— 50'

Le formol est donc un inhibiteur de l'invertine mais, son action est beaucoup moins marquée que dans le cas de l'émulsine. Même en présence de 5 ou 10 p. 100 de formol, la vitesse d'hydrolyse du saccharose est encore relativement grande, alors qu'elle était presque nulle lors de l'hydrolyse du salicoside par l'émulsine.

Voici des expériences analogues réalisées avec un autolysat. Les résultats sont de même ordre. L'action du formol semble cependant un peu plus marquée.

(1) Nous désignons sous le nom de formol la solution officinale à 35 p. 100 d'aldéhyde formique neutralisée par le carbonate de chaux.

Saccharose à 2 p. 100 + 0,10 p. 100 d'invertine.

Déviations	Initiale	Après 1 jour	Après 7 jours
Témoin.....	+ 2°32'	— 46'	— 44'
Formol 1 p. 100.....	+ 2°32'	— 40'	— 42'
Formol 2 —	+ 2°32'	— 36'	— 36'
Formol 5 —	+ 2°32'	— 26'	— 26'
Formol 10 —	+ 2°32'	+ 16'	+ 1° 4'

Nous avons obtenu des résultats absolument comparables avec une invertine purifiée suivant la méthode d'EULER et SVANBERG [92].

Enfin, nous avons voulu voir si l'action serait la même sur l'invertine d'*Aspergillus*.

Nous avons fait agir le liquide fermentaire sur du saccharose à 2 p. 100.

Saccharose à 2 p. 100 + 40 p. 100 du liquide fermentaire d'Aspergillus.

Déviations	Initiale	Après 5 jours	Après 10 jours	Après 20 jours
Témoin.....	+ 2°32'	— 20'	— 34'	— 44'
Formol 1 p. 100.....	+ 2°32'	— 24'	— 34'	— 44'
Formol 2 —	+ 2°32'	— 8'	— 34'	— 40'
Formol 5 —	+ 2°32'	+ 50'	+ 2'	— 22'
Formol 10 —	+ 2°32'	+ 1°44'	+ 14'	+ 56'

L'invertine d'*Aspergillus niger* semble plus sensible que l'invertine de levure à l'action du formol.

Peut-être est-ce dû au fait que, dans le cas de l'*Aspergillus* il y a peu de gangué. En est-il de même avec la poudre fermentaire d'*Aspergillus* ?

*Saccharose à 2 p. 100 + 1 p. 100 de poudre fermentaire
d'Aspergillus.*

Déviations	Initiale	Après 5 jours	Après 7 jours
Témoin.....	+ 2°32'	— 22'	— 36'
Formol 1 p. 100.....	+ 2°32'	— 20'	— 36'
Formol 2 —	+ 2°32'	— 24'	— 36'
Formol 5 —	+ 2°32'	— 52'	— 32'
Formol 10 —	+ 2°32'	+ 1° 4'	+ 56'

La poudre est donc moins sensible à l'action du formol que le liquide fermentaire.

Mode d'action du formol et interprétation des résultats.

Nous avons voulu tout d'abord vérifier que le formol n'agissait pas sur le principe dédoublable. Pour cela, à une solution de saccharose, nous avons ajouté 10 p. 100 de formol et après huit jours de contact nous avons mis l'invertine ; la marche de l'hydrolyse est identique à ce qu'elle est quand on ajoute le formol en même temps que l'invertine. Signalons cependant que, sous l'influence du formol, il y a une légère augmentation du pouvoir rotatoire, cette variation, négligeable dans les conditions où nous avons procédé, devient sensible avec des solutions concentrées (10 ou 20 p. 100) de saccharose. Nous avons déjà signalé ce fait à propos de l'action de l'émulsine sur le lactose en présence de formol.

Par contre, si l'on met l'invertine en contact avec la solution de formol et qu'on ajoute le saccharose après quelques jours, la vitesse de l'hydrolyse est très lente dès le début. C'est donc bien sur l'invertine qu'agit le formol. C'est un inhibiteur de l'hydrolyse diastasique du saccharose.

Cette inhibition peut porter soit sur la vitesse d'hydrolyse soit sur la position du point anguleux de la courbe $V = f(t)$, ainsi que nous l'avons déjà dit à propos de l'action du formol sur l'émulsine.

Tout récemment, au cours de notre travail, Mlle A. CHAUDUN [65] a étudié le mode d'action du formol sur l'invertine et a démontré que le formol modifie à la fois la vitesse de réaction et la position du point anguleux ; en même temps que la vitesse s'abaisse, on voit croître la quantité de saccharose, qui reste en solution, au moment où la vitesse d'inversion cesse d'être constante dans le temps. L'influence du formol est donc à rapprocher de celle de l'alcool méthylique ou éthylique.

Mais une autre question se pose, l'action du formol est-elle de nature physique ou chimique ?

MYRBÄCK [161] rapporte l'inactivation du ferment à la formation d'un dérivé méthylénique, donc à une action chimique. La destruction progressive serait due à ce que la combinaison « enzyme-méthylène » formée serait moins stable que l'enzyme libre ; en se détruisant, elle permettrait à de nouvelles quantités d'enzyme de se combiner au formol.

Comme pour l'émulsine, nous avons voulu reprendre d' aussi près que possible l'étude du mécanisme des phénomènes.

Par contact avec l'invertine, qui renferme des protides, il s'établit une réaction de SÖRENSEN avec libération d'acide et formation de combinaisons méthyléniques, mais cette réaction suffit-elle à expliquer l'inhibition du ferment ?

L'action inhibitrice du formol n'est ni immédiate, ni absolue. Les modifications subies par l'invertine sont réversibles. En effet, une invertine inactivée par le formol recouvre, tout au moins partiellement, son activité par simple précipitation alcoolique. Cela donne à penser qu'on se trouve en présence de modifications réversibles et peut-être d'ordre physique.

Nous avons voulu déterminer la quantité de formol fixé par l'invertine en dosant le formol restant par la méthode de GROS [108] à l'iodomercurate. Nous avons opéré comparativement sur une solution de peptone. On a donc préparé :

Une solution renfermant 10 p. 100 de formol officinal (contenant 33,5 p. 100 d'aldéhyde formique ;

Une solution de peptone à 10 p. 100 renfermant 10 p. 100 de formol ;

Une suspension de 10 grammes d'invertine dans de l'eau distillée contenant 10 p. 100 de formol.

On a dosé l'aldéhyde formique d'après la technique suivante :

Dans une fiole d'Erlenmeyer on introduit 5 cm³ de liqueur diluée au dixième et 35 cm³ de solution d'iodomercurate de po-

tassium (GROS [108]), puis 20 cm³ de lessive de soude pure. Après 15 minutes à 20 minutes, on acidule par ClH au demi, ajouté par petites fractions et en refroidissant sous un courant d'eau. On verse 20 cm³ de solution décimale d'iode et l'on agite jusqu'à dissolution complète du précipité. On titre l'excès d'iode par l'hyposulfite ; soit n cm³ la quantité d'hyposulfite employée, la teneur en HCHO pour 100 cm³ de liqueur est calculée d'après la formule $p = 3(20-n)$.

Voici les résultats obtenus (en g. d'aldéhyde pour 100 cm³ de liqueur).

HCHO p. 100	Au départ	Après 2 jours	Après 8 jours
Solution de formol à 10 p. 100.....	3,35	3,35	3,35
Peptone formolée à 10 p. 100.....	3,35	2,72	2,60
Invertine formolée à 10 p. 100.....	3,35	3,08	2,77

Il y a donc une très petite quantité de formol qui disparaît. L'invertine a fixé une partie du formol et cette fixation doit être rapportée à la réaction de SÖRENSEN ; il y a en même temps diminution du pH. Ce changement d'acidité est faible (1) et ne peut expliquer l'action inhibitrice du formol. Nous avons vérifié d'ailleurs qu'en milieu tamponné l'action du formol est la même.

S'il est exact qu'il se forme des dérivés méthyléniques, rien ne prouve que cette réaction a lieu avec la partie active du ferment (2).

De plus, le ferment recouvrant partiellement son activité par précipitation alcoolique, ou dialyse, il faudrait admettre que les méthylène-ferments formés sont très peu stables. Nous sommes donc amené à considérer que le phénomène d'inhibition est dû à une modification physique des micelles de l'invertine.

Quand on ajoute une assez forte quantité de formol à une solution d'invertine, le liquide se trouble et il se forme des flocons blanchâtres.

L'action du formol consisterait dans une modification de

(1) Dans les cas extrêmes le pH passe de 5,6 à 5,3.

(2) D'autant plus que l'action inhibitrice ne semble pas en rapport avec la concentration de l'enzyme mais avec celle du formol.

l'état colloïdal du ferment. Nous avons déjà émis la même hypothèse à propos de l'émulsine. A ce point de vue, l'action du formol se rapprocherait de celle de l'alcool éthylique. Il y aurait agglutination, agglomération des micelles diastasiques, la diminution de surface qui en résulte expliquerait la diminution d'activité observée.

Action de l'acroléine sur l'invertine *in vitro*.

Cette étude de l'acroléine ou aldéhyde acrylique est assez succincte, étant donnés : d'une part, l'instabilité de ce corps, d'autre part, son maniement difficile à cause des propriétés lacrymogènes bien connues. En particulier, les examens polarimétriques des liquides contenant de l'acroléine sont pénibles à effectuer.

L'acroléine est très toxique pour l'invertine.

L'invertine BOURQUÉLOT exposée 24 heures aux vapeurs d'acroléine voit son activité décroître. La levure elle-même, traitée dans les mêmes conditions, donne un extrait fermentaire ou un autolysat fortement atténué.

Voici un exemple pour les autolysats essayés sur du saccharose à 2 p. 100.

Saccharose à 2 p. 100 + 10 p. 100 d'autolysat.

Déviation	Initiale	Après 1 heure	Après 8 jours	Après 15 jours
Autolysat témoin.....	+ 2°34'	— 40'	— 42'	— 42'
Autolysat après acroléine...	+ 2°34'	+ 1°40'	± 0	— 40'

En résumé cette étude de l'invertine *in vitro* nous a montré que l'action préalable des anesthésiques sur la levure permettait, dans une certaine mesure, d'augmenter la quantité d'extrait fermentaire obtenu, ainsi que l'activité des liquides fermentaires. Néanmoins cette action n'est pas suffisante et il faut la compléter soit par une autolyse, soit par une destruction des membranes cellulaires de la levure. Quant à l'action du chloroforme ou de l'éther sur l'activité hydrolysante de la sucrase *in vitro* elle est pratiquement nulle.

Il n'en est pas de même avec le formol et l'acroléine qui retardent l'hydrolyse du saccharose.

Nous avons surtout étudié l'action du formol. Nous avons constaté que l'invertine de levure était moins sensible à l'action inhibitrice du formol que l'invertine du liquide fermentaire d'*Aspergillus*. Cependant cette action est beaucoup moins marquée que dans le cas de l'émulsine, même en présence de 5 p. 100 de formol l'activité hydrolysante de la sucrase est encore très satisfaisante.

Quant au mode d'action, il semble être, comme dans le cas de l'émulsine, d'ordre physique et consisterait en une modification de l'état colloïdal. L'action retardatrice exercée par le formol sur l'hydrolyse du saccharose a été étudiée par Mlle CHAUDUN [65] qui a montré qu'il y avait non seulement diminution de la vitesse de réaction, mais aussi augmentation de la quantité apparente de ferment.

Interprétation des résultats obtenus avec l'invertine *in vivo* et *in vitro*.

Au cours de l'étude de l'invertine *in vivo* chez les différents organes végétaux sous l'influence des vapeurs employées, nous avons constaté, suivant les conditions opératoires, une synthèse ou une hydrolyse des holosides tributaires de l'invertine. Il semble donc que, comme dans le cas de l'émulsine, il puisse y avoir, sous l'influence de certaines substances organiques volatiles, stimulation non seulement de l'activité hydrolysante de la sucrase, fait déjà connu et dont nous avons approfondi l'étude, mais aussi de son activité synthétisante.

Nous ne reviendrons pas ici sur le mécanisme d'action des substances envisagées puisque nous avons déjà discuté longuement de ce phénomène, lors de l'étude de l'émulsine. Rappelons simplement, qu'en dehors de la plasmolyse, il semble qu'il faille envisager, sous l'influence de certains corps organiques volatils, la dissociation *in vivo* de complexes fermentaires, complexes dont la nature exacte nous est encore inconnue, mais dont l'existence semble démontrée par les faits observés. D'autre part, à côté de cette action directe sur les diastases, nous croyons qu'il faut également tenir compte des modifications de milieu, changeant les conditions d'équilibre et favorisant, suivant les conditions, l'action synthétisante ou l'action hydrolysante des osidases.

A propos de la sucrase, on peut se demander, lorsqu'il y a augmentation des holosides sous l'influence de certaines vapeurs, s'il y a synthèse du saccharose *in vivo* ?

Si l'on consulte l'indice biochimique, nous voyons que celui-ci est, en général, voisin de l'indice théorique du saccharose (603) : il est donc probable que, dans certains cas tout au moins, il y a formation de saccharose. Cependant, pour affirmer un tel fait, il faudrait tenter l'extraction de cet holoside et l'identifier avec le saccharose. Dans d'autres cas, quand l'indice est éloigné de celui du saccharose, il faudrait admettre la formation d'autres holosides de nature inconnue.

Comment se forme le saccharose ? Quand il y a en même temps, lors des essais biochimiques, diminution des sucres réducteurs avant l'action de l'invertine, on peut imaginer que

c'est aux dépens de ces sucres réducteurs que se sont formés le saccharose et les holosides de nature inconnue.

On peut aussi admettre, comme l'ont déjà suggéré plusieurs auteurs, que ces holosides proviendraient de l'hydrolyse de l'amidon. Cependant signalons que dans le cas de la Banane, chez laquelle nous avons dosé en même temps l'amidon et les holosides tributaires de l'invertine, il n'y avait pas toujours coïncidence entre l'augmentation des holosides et la diminution de l'amidon.

Peut-être aussi le mécanisme est-il plus compliqué, et la formation de saccharose a-t-elle lieu au cours d'une réaction analogue à celle qui a été imaginée par OPARIN et KURSANOW [167], qui semblent avoir réalisé la synthèse biochimique du saccharose *in vitro*, sous l'influence de l'invertine, en passant par un ester phosphorique du fructose instable (ces auteurs font en effet agir leur invertine sur une solution concentrée de sucre interverti en présence de phosphate monocalcique). Cette hypothèse n'est pas à rejeter, surtout depuis que BARRENSCHEEN et PANY [10] chez l'*Elodeia canadensis*, BURKARD et NEUBERG [60] chez la Betterave, ont pu mettre en évidence la présence d'hexosephosphates chez les végétaux.

Remarquons aussi que, contrairement à ce qui a lieu avec l'émulsine, le formol et l'acroléine agissent dans le même sens que le chloroforme et l'éther. Cela se produit, croyons-nous, pour deux raisons différentes.

Tout d'abord, comme nous l'avons vu dans l'étude de l'invertine *in vitro*, le formol et l'acroléine ont une action inhibitrice beaucoup moins marquée pour l'invertine que pour l'émulsine. C'est pourquoi ce ne sont pas non plus des inhibiteurs *in vivo*.

D'autre part, certaines expériences (inactivité du chloroforme, de l'éther *in vitro*, obtention de produits fermentaires plus actifs que les témoins après action de vapeurs organiques) nous amènent à supposer, comme pour l'émulsine, l'existence d'un complexe diastasique. Mais ce complexe n'est peut-être pas de même nature que dans le cas de l'émulsine et c'est ce qui expliquerait les divergences observées avec l'émulsine, et en particulier que des substances comme le formol et l'acroléine soient capables de démasquer l'invertine et de provoquer l'hydrolyse des holosides.

Cette manière de voir est d'ailleurs en accord avec les travaux de WILLSTAETTER [201] qui envisagea l'étude de la su-

crase dans la cellule : ce savant constata que la levure ne cédait pas son invertine à l'eau, et que la destruction de la membrane ne suffisait pas à elle seule à libérer le ferment.

L'invertine serait liée à des combinaisons organiques de poids moléculaire élevé et, le complexe n'étant pas dissocié par les diastases protéolytiques mais par l'extrait de malt, il semble qu'il soit de nature glucidique. C'est ce qui pourrait expliquer, que, bien qu'étant aussi *in vivo* sous forme de complexe diastasique, l'invertine, sous l'influence des substances envisagées (en particulier le formol et l'acroléine) ne nous ait pas donné les mêmes résultats que l'émulsine *in vivo*.

CONCLUSIONS.

Au cours de l'étude de l'action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine sur l'invertine *in vivo* et *in vitro*, nous avons constaté les faits suivants :

In vivo et à forte dose (en vapeur saturante) il y a une hydrolyse rapide des holosides tributaires de l'invertine. Les résultats obtenus sont analogues quel que soit le végétal envisagé (feuilles d'*Aucuba*, de Laurier-cerise, de Rue, de Gaulthérie, Banane) et quelle que soit la substance volatile employée : contrairement à ce qui a lieu avec l'émulsine, le formol et l'acroléine ne sont donc pas des inhibiteurs de la sucrase *in vivo*.

L'action du chloroforme est plus rapide que celle de l'éther, qui est elle même plus intense que celle du formol ou de l'acroléine.

Chez l'*Aucuba* la proportion d'holosides dédoublés est relativement faible (elle n'atteint que 8 p. 100 au bout d'une heure avec le chloroforme en vapeur saturante) elle est de beaucoup inférieure à la proportion d'hétéroside dédoublé dans le même temps ; c'est le phénomène inverse qui a lieu chez le *Laurier-cerise* (au bout d'une heure de chloroforme en vapeur saturante la proportion d'holosides dédoublés est de 30 p. 100, elle atteint 60 p. 100 en trois heures).

Enfin, fait important, on peut constater dans certaines conditions (au début de l'action des substances envisagées) non pas une diminution mais une augmentation d'holosides (celle-ci peut atteindre 20 et même 30 p. 100). Avant la phase d'hydrolyse il y aurait donc une phase de synthèse, les vapeurs employées stimuleraient non seulement l'activité hydrolysante, mais aussi l'activité synthétisante de l'invertine. Ces substances volatiles agiraient, comme nous l'avons déjà montré, à propos de l'émulsine, à la fois sur les diastases (qu'elles libéreraient d'un complexe) et sur le milieu qu'elles modifieraient, changeant ainsi les états d'équilibre et favorisant, suivant les conditions, l'action synthétisante ou l'action hydrolysante des glucidases.

Quant aux holosides formés, il semble, d'après l'examen de l'indice biochimique, que, tout au moins dans certains cas, il y ait synthèse de saccharose *in vivo* sous l'influence des substances volatiles employées.

A faible dose et pour des expériences de longue durée, nous

avons constaté dans tous les cas une hydrolyse très marquée, parfois totale (cas du Laurier-cerise) des holosides.

En ce qui concerne les produits fermentaires, ils se montrent en général (sauf dans le cas des organes végétaux traités par l'acroléine) plus actifs que les témoins.

In vitro, le chloroforme et l'éther sont sans action sur l'activité de la sucrase au cours de l'hydrolyse du saccharose, ils ne modifient pas la vitesse de réaction. Il n'en est pas de même du formol qui non seulement retarde l'action hydrolysante de la sucrase, mais aussi, comme l'a montré récemment Mlle CHARDUN [65], provoque une augmentation de la « quantité apparente » de ferment. L'acroléine a une action analogue.

Remarquons cependant que cette action inhibitrice est beaucoup moins marquée que dans le cas de l'émulsine, fait qui explique pourquoi le formol et l'acroléine, même en vapeur saturante, ne sont pas des inhibiteurs de la sucrase *in vivo*.

Nous avons enfin montré qu'*in vitro* l'action inhibitrice du formol et de l'acroléine était d'ordre physique plutôt que chimique ; comme dans le cas de l'émulsine, il s'agirait d'une floculation du ferment, l'agglomération des micelles diastasiques provoquant une diminution de surface qui expliquerait la diminution d'activité observée.

CINQUIÈME PARTIE.

Etude de l'amylase.

Généralités.

De même que l'amidon est un glucide très répandu chez les végétaux chlorophylliens, le ferment qui l'hydrolyse ou **amylase** existe dans la plupart des végétaux.

Le premier ferment connu a d'ailleurs été l'amylase de l'Orge germé (PAYEN et PERSOZ, 1832).

L'amylase est en réalité, non pas un ferment, mais un complexe fermentaire transformant l'amidon en maltose.

Nous ne pouvons ici discuter de la constitution de l'amidon ; nous rappellerons seulement que l'amidon est un polyholoside, existant chez les végétaux à l'état figuré, sous forme de grains très différents de forme et de constitution, suivant l'espèce végétale considérée.

Ces grains d'amidon seraient constitués par de l'amylose à l'intérieur, et par de l'amylopectine à la périphérie, ce dernier étant une sorte d'éther phosphorique, et donnant l'empois d'amidon.

Sous l'influence de l'amylase, il y a liquéfaction, puis saccharification, se traduisant par la formation de dextrines, peu définies au point de vue chimique, puis de maltose, terme ultime de l'hydrolyse. C'est pourquoi certains auteurs ont voulu différencier dans l'amylase une amylopectinase ou amylophosphatase et une amylase proprement dite ou dextrinase (1) (BOURQUELOT [23]).

(1) D'après OHLSON [165] il faudrait distinguer une amylase α et une amylase β (voir au début de ce travail les généralités sur l'amylase).

Quoi qu'il en soit de la constitution de l'amidon et de l'amy-lase, l'hydrolyse s'effectue suivant le schéma classique :

Amidon → amidon soluble → dextrine → maltose

Nous nous sommes proposé de rechercher ce que devenait l'amy-lase sous l'influence des anesthésiques (chloroforme, éther), et des substances inhibitrices des ferments *in vitro* comme le formol et l'acroléine.

Nous avons suivi l'action sur l'amy-lase indirectement en dosant l'amidon.

Dosage de l'amidon. — Le dosage de l'amidon chez les végétaux est assez délicat, tout au moins quand on veut atteindre une certaine précision.

Il faut éliminer les autres glucides par épuisement à l'alcool bouillant, et doser l'amidon sur le résidu insoluble dans l'alcool, soit par hydrolyse acide, soit par hydrolyse diastasique.

L'hydrolyse acide doit être évitée, car on risque d'hydrolyser d'autres principes que l'amidon ; l'hydrolyse diastasique est plus spécifique. On peut réaliser une méthode biochimique de dosage de l'amidon.

Malheureusement, si l'on emploie comme amy-lase la diastase de l'orge germé, comme l'ont fait BOURQUELOT et BRIDEL [29], les résultats sont assez imprécis, et il faut procéder par comparaison avec de la fécule de pommes de terre. On sait en effet que l'hydrolyse de l'amidon par l'amy-lase du malt est rarement complète.

C'est pourquoi Mlle BOURDOUIL [22] a proposé une méthode de dosage biochimique de l'amidon en remplaçant la diastase par la pancréatine.

Dans ces conditions, l'amidon est presque intégralement transformé en glucose grâce à la présence de maltase dans la pancréatine. Cette dernière est évidemment moins spécifique que la diastase, et on risque d'hydrolyser d'autres principes que des glucides. Néanmoins en procédant dans certaines conditions et en faisant des témoins, on arrive à diminuer les causes d'erreurs.

A. — Étude de l'amylase « *in vivo* ».

Travaux antérieurs. — La variation de la teneur en amidon de certains végétaux sous l'influence des anesthésiques ou autres corps a déjà été étudiée par quelques auteurs.

D'après MAIGE [148], on peut inhiber partiellement ou totalement la formation de l'amidon par les anesthésiques, ou par la plasmolyse, tandis que persiste l'action amylolytique.

MAZÉ [156] constate que l'eau saturée de chloroforme ou d'éther ne provoque pas l'hydrolyse de l'amidon chez la pomme de terre, alors que ces mêmes substances provoquaient l'hydrolyse du saccharose chez la betterave.

DENNY [83-84-86] étudiant le forçage des tubercules de pommes de terre sous l'influence de différents produits (éthylène-chlorhydrine, thio-urée, sulfocyanate de sodium, etc...) dose l'amidon, dans les tubercules forcés et dans les tubercules normaux, par hydrolyse acide. Il constate une diminution de l'amidon et une augmentation du saccharose ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'amylase et de la sucrase. Enfin, plus récemment, POUSSSET [176] étudia les variations de l'amidon chez les fruits d'Orge et les graines de Pois sous l'influence du chloroforme. Il fait agir cette substance, en vapeur saturante, pendant des temps variables, et il constate que la quantité d'amidon ne varie pas sensiblement sous l'influence de l'anesthésique. Bien plus, si l'on réussit à faire germer les graines de Pois, et les fruits d'Orge après une action brève (15 à 30 minutes) du chloroforme, la quantité d'amidon diminue plus vite dans les lots témoins que dans les lots soumis à l'action du chloroforme.

Nous avons repris ces expériences en faisant agir non seulement le chloroforme, mais aussi l'éther, le formol, et l'acroléine, non plus au cours de la germination, mais au cours de la maturation du fruit.

Nous nous sommes adressé, pour étudier l'amylase *in vivo*, à un fruit dont la composition est bien connue au point de vue des glucides : la Banane.

La maturation de la Banane a déjà été étudiée par de nombreux auteurs : BOUSSINGAULT, puis BUIGNET [59] signalent la transformation de l'amidon en saccharose, tandis que TALLARICO [189], puis BAILEY [9] mettent en évidence un certain nombre de diastases (amylase, invertase) au cours de la matu-

ration (1). La question fut reprise récemment, d'une manière plus précise, par Mlle BOURDOUIL [21] qui fit, entre autres, de nombreux dosages d'amidon, de saccharose, de sucre réducteur au cours de la maturation. Nous avons déjà parlé des variations du saccharose à propos de l'étude de l'invertine, nous n'y reviendrons donc pas, et nous envisagerons seulement ici la question de l'amidon.

Mlle BOURDOUIL [21] constata au cours de la maturation une diminution très nette du taux de l'amidon. Que devient cet amidon sous l'influence des vapeurs de chloroforme et d'éther ?

Ces substances, employées lors du forçage, provoquant la maturation des fruits, provoquent-elles aussi l'hydrolyse de l'amidon chez la Banane ? C'est ce que nous nous sommes proposé de rechercher.

Nous avons employé les substances habituelles (chloroforme, éther, formol, acroléine) que nous avons fait agir à forte dose (en vapeur saturante à 20°) et à faible dose (air contenant 1 p. 1.000 de ces différents corps) sur des Bananes des Canaries (*Musa Sapientum* L.) incomplètement mûres (2) dont le poids moyen était de 85 grammes (dont 50 à 55 grammes de pulpe).

On a fait des lots de deux Bananes, aussi identiques entre elles que possible, au point de vue poids et maturité.

Lors des expériences en vapeur saturante, le lot chloroformé noircit au bout d'un quart d'heure ; des gouttes de liquide exsudent à la surface de la peau ; l'exolyse est donc ici très visible, puis il y a ramollissement du fruit.

Avec l'éther, on constate à peu près les mêmes phénomènes, mais ils apparaissent moins rapidement et le noircissement est moins intense.

Dans le cas du formol et de l'acroléine, on constate aussi une exsudation ; celle-ci est même particulièrement marquée avec le formol, mais les Bananes ne noircissent pas ; elles deviennent simplement plus jaunes (3).

A faible dose (atmosphère contenant 1 p. 1.000 de ces différents corps) les phénomènes observés sont les mêmes, mais ils se produisent beaucoup moins rapidement.

Les résultats que nous allons exposer se rapportent à la

(1) Au cours de cette maturation il y a augmentation de l'activité de l'amylase et de la sucrase.

(2) Les Bananes employées étaient à peine jaunes, avec des endroits encore verts.

(3) D'après LOESCKE [147] ce changement de coloration est dû à une diminution de la quantité de chlorophylle et non à une augmentation des pigments jaunes (xanthophylle et carotène).

pulpe ; ils nous ont paru plus constants que ceux obtenus avec la peau. Ce fait a déjà été signalé par Mlle BOURDOUIL [21]. En effet, pour les peaux il y a une perte importante en eau et en sucre au cours des expériences, la liqueur sucrée qui exsude est difficile à recueillir ; le poids de la pulpe au contraire varie peu.

Technique. — La technique employée pour le dosage de l'amidon a été la suivante :

La pulpe, qui a été au préalable pesée et coupée en morceaux, est projetée dans 5 fois son poids d'alcool à 95° bouillant. Après 20 minutes d'ébullition, on décante l'alcool ; on pulvérise finement les Bananes et on fait un deuxième épuisement à l'alcool dans les mêmes conditions.

Les solutions alcooliques évaporées serviront à faire des essais biochimiques dont nous avons déjà donné les résultats lors de l'étude de l'invertine.

Le résidu insoluble dans l'alcool est recueilli, séché à l'étuve, pesé, et enfin pulvérisé au moulin. On prélève 1 gramme de cette poudre pour le dosage biochimique de l'amidon. Pour cela, on fait un empois en ajoutant à la poudre environ 60 cm³ d'eau distillée, et en faisant bouillir trois minutes, en agitant fréquemment, afin d'obtenir un empois bien homogène. On verse dans une fiole jaugée de 100 cm³ ; on lave à l'eau distillée le flacon ayant contenu l'empois, on laisse refroidir et on complète à 100 cm³. On ajoute 0 g.,50 d'extrait pancréatique (1), dont on vérifie l'absence de pouvoir réducteur et l'activité sur l'empois d'amidon titré. On laisse 4 jours à l'étuve à 40°. On détermine alors le sucre réducteur, par la méthode de G. BERTRAND, après défécation au demi par l'extrait de Saturne et élimination de l'excès de plomb par le sulfate de sodium au dixième. On ramène le chiffre trouvé (exprimé en glucose) à 100 cm³ de solution puis à 100 grammes d'organe frais.

Comme, dans ces conditions, 1 gramme d'amidon donne 1 gramme de sucre réducteur exprimé en glucose (2), le chiffre trouvé représentera la quantité d'amidon pour 100 grammes de pulpe de Banane à l'état frais.

Voici les résultats obtenus au bout d'une heure et de trois heures de chloroforme, d'éther, de formol ou d'acroléine en vapeur saturante et au bout de deux jours en atmosphère au millième.

(1) Mis aimablement à notre disposition par M. A. CHOAY.

(2) Ce qui correspond à 90 p. 100 du poids de glucose que devrait donner une hydrolyse intégrale de l'amidon.

TABLEAU XXXVI. — Action du chloroforme sur la Banane.

	Témoin 1 heure	CHCl ₃ 1 heure en vap. sat.	Témoin 3 heures	CHCl ₃ 3 heures en vap. sat.	Témoin 2 jours	CHCl ₃ à 1 p. 1000 2 jours
1) Résidu insoluble dans l'alcool	8,10	8,10	8,40	7,50	7,40	6,50
2) Sucre réducteur (exprimé en glucose) provenant de 1 g. de ce résidu après action de la pancréatine	0,217	0,235	0,217	0,235	2,231	0,244
3) Amidon p. 100 g. de pulpe	1,75	1,90	1,92	1,75	1,60	1,46

TABLEAU XXXVII. — Action de l'éther sur la Banane.

	Témoin 1 heure	CHCl ₃ 1 heure en vap. sat.	Témoin 3 heures	CHCl ₃ 3 heures en vap. sat.	Témoin 2 jours	Ether à 1 p. 1000 2 jours
1) Résidu insoluble dans l'alcool	8,10	8,50	8,40	7,40	7,00	6,00
2) Sucre réducteur provenant de 1 g. de ce résidu après action de la pancréatine	0,217	0,249	0,217	0,226	0,231	0,154
3) Amidon p. 100 g. de pulpe	1,75	2,11	1,92	1,67	1,61	0,78

TABLEAU XXXVIII. — Action du formol sur la Banane.

	Témoin 1 heure	Formol 1 heure en vap. sat.	Témoin 3 heures	Formol 3 heures en vap. sat.	Témoin 2 jours	Formol à 1 p. 100 2 jours
1) Résidu insoluble dans l'alcool	8,10	8,85	8,40	7,50	7,00	4,60
2) Sucre réducteur provenant de 1 g. de ce résidu après action de la pancréatine	0,217	0,200	0,217	0,249	0,281	0,101
3) Amidon p. 100 g. de pulpe	1,75	1,77	1,92	1,86	1,61	0,46

TABLEAU XXXIX. — Action de l'acroléine sur la Banane.

	Témoin 1 heure	Acroléine 1 heure	Témoin 3 heures	Acroléine 3 heures	Témoin 2 jours	Acroléine 2 jours
1) résidu insoluble dans l'alcool	8,10	8,90	8,40	8,20	7,00	6,30
2) sucre réducteur provenant de 1 g. du résidu après action de la pan-créatine	0,217	0,200	0,217	0,226	0,231	0,244
3) amidon p. 100 g. pulpe.	1,75	1,78	1,92	1,85	1,61	1,53

Le chloroforme et l'éther, en vapeur saturante, provoquent une légère augmentation (au bout d'une heure) puis une légère diminution (au bout de trois heures) de l'amidon (1). A faible dose et par une action prolongée il y a une diminution de l'amidon, celle-ci étant plus marquée dans le cas de l'éther (puisqu'elle atteint environ 50 p. 100 en deux jours).

Le formol et l'acroléine en vapeur saturante provoquent des changements de même ordre, mais moins accentués ; à faible dose, et par contact prolongé il y a au contraire diminution de l'amidon.

Les résultats obtenus avec l'amylase *in vivo* sont donc tout à fait comparables aux résultats obtenus avec l'émulsine et l'invertine ; ils sont néanmoins beaucoup moins marqués.

Essai des produits fermentaires correspondants.

En raison de la difficulté d'obtenir des poudres fermentaires, nous avons préparé des liquides fermentaires en faisant macérer les peaux de banane dans de l'eau toluénée pendant dix jours, puis nous avons essayé l'activité de ces liquides sur un empois d'amidon à 1 p. 100, en dosant le sucre réducteur formé, au bout d'un temps déterminé (4 heures), par la mé-

(1) Les variations sont très peu marquées dans le cas du chloroforme en vapeur saturante ; elles sont beaucoup plus nettes avec l'éther. Ce fait explique peut-être pourquoi Pousser, employant uniquement le chloroforme en vapeur saturante sur le Pois et l'Orge en germination, n'a pas pu constater de variations sensibles de l'amidon,

thode de G. BERTRAND [13] (en tenant compte bien entendu du pouvoir réducteur initial des liquides fermentaires). Voici les résultats obtenus :

*Empois d'amidon à 1 p. 100 + 10 p. 100 de liquide fermentaire
(Sucre réducteur exprimée en mg. de glucose p. 100 cm³).*

Liquide témoin	248
Liquide obtenu après 4 heures de chloroforme en vapeur saturante	274
Liquide obtenu après 4 heures d'éther	291
Liquide obtenu après 4 heures de formol.....	225
Liquide obtenu après 4 heures d'acroléine.....	251

On voit qu'après traitement par les vapeurs anesthésiques, il y a augmentation de l'activité de l'amylase ; dans le cas du formol, il y a au contraire une légère atténuation tandis qu'il y a peu de changement avec l'acroléine.

Les substances volatiles envisagées provoquent donc, avec une rapidité variable, la maturation de la Banane ; les phénomènes constatés sont sensiblement les mêmes qu'au cours de la maturation normale de la Banane (jaunissement puis noircissement du fruit, diminution de la quantité d'amidon, augmentation de l'activité de l'amylase).

B. — Étude de l'amylase « *in vitro* ».

Comme lors de l'étude des autres glucidases (émulsine, invertine, rhamnodiastase, etc...) nous avons fait intervenir les différentes substances envisagées (chloroforme, éther, formol, acroléine), soit au cours de la préparation de l'amylase, soit au cours de l'hydrolyse de l'amidon.

Les différents produits ont été essayés vis-à-vis de la fécule de pomme de terre ou de l'amidon soluble Poulenc (préparé selon la méthode de ZULLKOWSKY).

L'essai, au point de vue de son activité amylolytique, d'une diastase est assez difficile à réaliser. En effet, non seulement la préparation diastasique, mais encore les conditions opératoire, l'origine de l'amidon employé, le pH de l'eau distillée, la façon dont on a fabriqué l'empois, influent sur les résultats obtenus.

L'essai (indiqué à l'article Diastase) de la Pharmacopée française est peu précis. Il consiste à déterminer, à l'aide de la liqueur de FEHLING, le pouvoir réducteur d'un empois d'amidon, obtenu avec de la fécule de pomme de terre et de l'eau distillée bien neutre, après action de la diastase à 55°, pendant 1 heure.

Sans faire ici l'exposé bibliographique (1) de cette question de détermination de l'activité de la diastase de l'Orge germé, nous dirons simplement que nous avons tenu compte des travaux de GRIMBERT [107], d'ASTRUC et RENAUD [7], de PÉNAU et AUDIC [172] et que nous avons adopté le mode de préparation suivant :

La fécule de pomme de terre, dont on a déterminé la teneur en eau, est mise en suspension dans de l'eau bidistillée. On porte au bain-marie bouillant et on agite constamment et énergiquement jusqu'à formation de l'empois. On maintient alors la fiole dans le bain-marie pendant 3 minutes ; on met ensuite dans une étuve à 55°. Quand l'empois a atteint cette température, on ajoute la diastase (10 cg. pour 100 grammes de fécule desséchée) et on agite fortement. La liquéfaction se fait en quelques minutes. On maintient une heure à 55° en agitant fréquemment. On détermine ensuite le pouvoir réducteur par la méthode de G. BERTRAND [13] en opérant sur 10 cm³ de so-

(1) Voir à ce sujet l'article documenté de FABRE et PÉNAU [93].

lution, additionnée de 1 gramme de carbonate de potasse (pour arrêter l'hydrolyse) et filtrée.

Dans certains cas (en particulier pour des produits peu actifs) nous avons préféré employer l'amidon soluble POULENC. On évite de cette façon la préparation de l'empois et, étant donné qu'il n'y a pas de liquéfaction préalable, l'action est plus rapide.

L'essai simultané sur un empois d'amidon et sur l'amidon soluble nous a donné des indications intéressantes, lors de notre étude de l'action du formol sur l'action hydrolysante de la diastase.

Nous avons préparé différents produits fermentaires, à partir de l'Orge germé ou de la farine de malt (1) en faisant agir le chloroforme, l'éther, le formol ou l'acroléine à différents stades de préparation.

Nous avons mis de l'Orge germé pendant 24 heures dans de l'air contenant 1 p. 1000 de chloroforme, éther, formol, acroléine. Puis, nous avons fait macérer pendant 24 heures les lots ainsi obtenus dans 4 fois leur poids d'eau distillée, additionnée de toluène. Les liquides obtenus ne présentaient pas de différence sensible avec le liquide témoin.

Nous avons, d'autre part, fait agir les mêmes substances en vapeur saturante pendant 4 heures sur de la farine de malt, en atmosphère humide, puis, nous avons fait macérer les lots dans deux fois leur poids d'eau distillée. On a pressé le marc, et ajouté aux liquides 3 volumes d'alcool à 90°. On a recueilli les précipités douze heures après, le rendement était sensiblement identique (pour 200 grammes de farine de malt on obtient ainsi environ 3 grammes d'extrait fermentaire).

Ces différents produits ont été essayés sur l'empois d'amidon suivant la technique précédemment indiquée.

La farine de malt ayant subi l'action du formol et de l'acroléine a donné des diastases atténuées. Il en a été de même à un degré moindre de la diastase « chloroformée ». La diastase, éthérée avait la même activité que le témoin. Dans certaines conditions, le chloroforme peut donc se montrer nocif pour l'amylase de l'Orge germé. Ce fait est à rapprocher des résultats obtenus *in vivo* par POUSSÉ [176] lors de ses expériences sur les Pois et l'Orge en germination. Non seulement le chloroforme ne provoque pas de variations de l'amidon mais si l'on remet les graines en germination, l'hydrolyse de l'amidon

(1) Gracieusement fournie par la firme HEUDEBERT.

est retardée par rapport au témoin ; il semble qu'il y ait eu inhibition de l'amylase.

Nous avons vu également, lors de nos expériences sur la Banane, que le chloroforme ne provoquait que peu de changement du taux de l'amidon, tandis que l'éther avait une action bien plus marquée.

Enfin, signalons que SHERMANN et WAYMANN [186], au cours d'un travail sur l'action des antiseptiques sur différentes amylases, constatent que le chloroforme, bien que n'affectant pas l'activité du malt, diminue cependant l'action des produits fermentaires qu'on en retire.

Il nous reste à envisager l'action du chloroforme, de l'éther, du formol et de l'acroléine sur la diastase au cours de l'hydrolyse de l'amidon.

Le chloroforme et l'éther n'ont aucune influence.

Il n'en est pas de même avec le formol et l'acroléine qui ralentissent fortement cette hydrolyse. Mais avec ces substances réductrices, nous nous trouvons toujours devant la même difficulté, on ne peut pas apprécier le taux de l'hydrolyse par la détermination du pouvoir réducteur (1), il faut suivre le phénomène uniquement au polarimètre.

Voici les résultats obtenus avec le formol employé à doses croissantes sur une solution d'amidon soluble à 1 p. 100, en présence d'un centigramme de diastase ($T = 55^\circ$).

Amidon soluble à 1 p. 100 + 0,01 p. 100 d'amylase.

Déviation	Après 15 minutes	Après 30 minutes	Après 1 heure
Témoin.....	+ 1°	+ 2°	+ 2°50'
Formol 1 p. 100.....	+ 56'	+ 2°20'	+ 3°20'
Formol 2 —	+ 50'	+ 2°20'	+ 3° 2'
Formol 5 —	+ 4'	+ 2°34'	+ 3° 4'
Formol 10 —	± 0	+ 2°50'	+ 3° 4'

Au bout d'un certain temps, la déviation des lots formolés est plus forte que celle du témoin. Cela paraît paradoxal à pre-

(1) Nous avons essayé de procéder par comparaison avec des solutions de formol de même titre, mais les résultats obtenus n'ont pas été encourageants.

mière vue. En réalité, nous croyons que cela est dû à l'action du formol sur le maltose formé en présence de formol. Le pouvoir rotatoire du maltose augmente. Nous avons déjà signalé cette influence du formol sur la déviation polarimétrique lors de l'étude de l'émulsine *in vitro*.

L'action retardatrice du formol sur l'hydrolyse de l'amidon est donc difficile à suivre avec précision ; dans le cas de l'amidon soluble, elle semble peu marquée. Nous avons repris ces expériences, en remplaçant l'amidon soluble par de la fécule de pommes de terre, et en faisant un empois.

On remarque dans ce cas, qu'en présence de formol (même à 1 p. 100), la liquéfaction ne se fait pas. Si l'on examine au polarimètre, après défécation et dilution (au demi), on constate, qu'au bout d'une heure, le témoin atteint la même déviation que dans le cas de l'amidon soluble, tandis que la déviation des lots formolés est pratiquement nulle. Il en est de même de l'acroléine.

Comment interpréter ce phénomène ?

Il semble que le formol inhibe surtout l'action liquéfiante de l'amylase, et qu'il agisse beaucoup moins sur son pouvoir saccharifiant. Le formol serait beaucoup plus inhibiteur de l'amylpectinase que de la dextrinase. Mais ce n'est là qu'une hypothèse qu'il faudrait vérifier par d'autres expériences (1).

(1) Il se peut aussi que le formol ait formé avec l'amidon un complexe difficilement hydrolysable par l'amylase.

CONCLUSIONS.

Nous nous sommes adressé, pour étudier l'action des vapeurs de chloroforme, d'éther, de formol et d'acroléine sur l'amylase *in vivo*, à un fruit dont la composition est bien connue au point de vue des glucides : la Banane.

Nous avons suivi l'action sur l'amylase indirectement en dosant l'amidon à l'aide de la méthode biochimique à la pancréatine.

Les phénomènes constatés sont de même sens, quelle que soit la substance employée (l'amylase *in vivo* se conduit donc comme l'invertine vis-à-vis des substances organiques envisagées).

Les variations sont, dans l'ensemble, peu accentuées (le chloroforme provoquant des variations moins nettes que l'éther) beaucoup moins que celles des hétérosides tributaires de l'émulsine, ou celles des holosides tributaires de l'invertine. Ce fait tient peut être à ce que l'amidon existe, non à l'état dissous dans le suc vacuolaire mais à l'état figuré sur des plastes.

Au début de l'action, en vapeur saturante (après 1 heure), on constate une légère augmentation de l'amidon ; si l'on prolonge l'action (après 3 heures) il y a au contraire hydrolyse. A faible dose (1 p. 1000) et par contact prolongé (2 jours), l'hydrolyse est beaucoup plus poussée, et peut atteindre 50 p. 100 dans le cas de l'éther, et même 71 p. 100 dans le cas du formol. Quant aux produits fermentaires correspondants, ils sont légèrement « activés » dans le cas du chloroforme et de l'éther.

In vitro, l'éther et le chloroforme sont sans action sur l'activité hydrolysante de la diastase de l'Orge germé ; cependant l'extrait de malt, soumis à l'action des vapeurs saturantes de chloroforme pendant quelques heures, donne des produits fermentaires moins actifs que les témoins.

Le formol et l'acroléine produisent, au contraire, un retard de l'hydrolyse ; dans le cas du formol, l'action inhibitrice est moins marquée si on fait l'essai non plus avec l'empois d'amidon, mais avec l'amidon soluble ; l'inhibition porterait donc surtout sur l'action liquéfiant de la diastase.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les différents chapitres de ce travail comportant des résumés détaillés ainsi que la discussion des résultats obtenus, nous nous bornerons ici à quelques conclusions d'ensemble au sujet de l'action de certaines substances organiques volatiles (chloroforme, éther, formol, acroléine) sur quelques glucidases *in vivo* et *in vitro*.

1° La première glucidase étudiée a été l'ÉMULSINE.

a) Nous exposerons tout d'abord les résultats obtenus *in vitro*. *In vitro* le chloroforme et l'éther sont sans action aussi bien sur l'activité hydrolysante que sur l'activité synthétisante de l'émulsine, tandis que le formol et l'acroléine sont des inhibiteurs ; cette action inhibitrice se manifeste déjà à faible dose (de l'ordre de 1 p. 100).

Nous avons étudié ce phénomène en détail à propos du formol. Nous avons montré que l'action retardatrice du formol se manifestait quelle que soit l'origine de l'émulsine (Amandes, graines de Lin, *Aspergillus*) et son degré de pureté. Elle est d'intensité inégale pour les différentes diastases de l'émulsine d'amande (salicosidase, amygdalosidase, glucosidase β , galactosidase β) et de la poudre fermentaire d'*Aspergillus* (maltase, tréhalase). Au point de vue mécanisme d'action, nous avons constaté qu'il y a non seulement diminution de la vitesse d'hydrolyse, mais aussi augmentation de la « quantité apparente » de ferment.

Enfin, le formol nous paraît agir par voie physique plutôt que par voie chimique. Nous avons apporté plusieurs arguments (dialyse, ultrafiltration, etc.) en faveur de cette hypothèse. Cette action physique consisterait en une modification de l'état colloïdal, il y aurait agglomération des micelles diastatiques, et la diminution de surface qui en résulterait expliquerait la diminution d'activité observée. Le formol serait à rapprocher à ce point de vue de l'alcool et de l'acétone.

Quant à l'acroléine, son mode d'action semble identique à celui du formol.

b) *In vivo*, notre étude de l'émulsine a porté sur des feuilles d'*Aucuba* et de Laurier-cerise chez lesquelles nous avons suivi les variations d'hétérosides, soit à l'aide de la méthode biochimique de BOURQUELOT, soit par le dosage de l'aglycone (aucubigénol ou acide cyanhydrique).

Sous l'influence des vapeurs de chloroforme ou de l'éther, nous avons constaté une hydrolyse qui peut être totale si l'on se place dans des conditions favorables. Cependant, fait important, cette hydrolyse semble l'aboutissement de phénomènes plus complexes puisqu'avec les feuilles de Laurier-cerise, en particulier au début de l'action des vapeurs de chloroforme ou d'éther, il y peut y avoir aussi augmentation d'hétéroside ; il y aurait donc *synthèse in vivo sous l'influence des vapeurs anesthésiques* ; le chloroforme et l'éther pourraient dans certaines conditions stimuler, non seulement l'action hydrolysante, mais aussi l'action synthétisante de l'émulsine *in vivo*.

Quant au mécanisme d'action (dont nous avons longuement discuté lors de nos conclusions sur l'émulsine), nous ne pouvons que formuler des hypothèses. Il nous semble qu'en dehors de la plasmolyse, signalée par GUIGNARD et qui reste un phénomène essentiel, il faille tenir compte, à la lumière des faits d'ordre cytologique, d'autres modifications protoplasmiques en particulier de la dissociation de complexes lipido-protidiques dont le chondriome est morphologiquement le type.

Nous croyons donc que l'émulsine *in vivo* se trouverait, tout au moins partiellement, sous forme de complexe (localisé peut être au niveau du chondriome et des plastes) dissociable sous l'influence des anesthésiques, tandis que l'hétéroside serait situé dans les vacuoles. Cette hypothèse nous paraît en accord avec les faits observés : l'émulsine n'est pas directement extractible des tissus végétaux, par contre les produits fermentaires obtenus après action de l'éther ou du chloroforme sont plus actifs que les témoins. Elle explique également pourquoi ces substances sont sans influence *in vitro* sur l'activité tant hydrolysante que synthétisante de l'émulsine et pourquoi, si l'on admet l'existence du ferment et de l'hétéroside dans une même cellule, il n'y aurait pas habituellement hydrolyse de ce dernier.

Quant à la plasmolyse et l'exolyse observées, elles amène-

raient une mise en contact du ferment libéré avec l'hétéroside provenant du vacuome.

Cependant, en plus de cette action directe sur les diastases, il nous semble qu'il faille également envisager une action indirecte par modification des conditions de milieu. Cette modification, tout au moins au début de l'action de l'anesthésique, pouvant favoriser l'action synthétisante de l'émulsine (tandis que dans une deuxième phase d'action des anesthésiques, les conditions de milieu seraient telles qu'elles favoriseraient l'hydrolyse).

Il nous reste à envisager l'influence des vapeurs de formol et d'acroléine sur l'émulsine *in vivo*. A forte dose (en vapeur saturante) ces substances ne provoquent pas de variations d'hétérosides. Nous avons préparé des poudres fermentaires après action de ces substances, elles se sont montrées atténuées par rapport aux poudres témoins. Nous pensons qu'il y a eu inhibition de l'émulsine *in vivo* et par un mécanisme analogue à ce qui a été constaté *in vitro*.

A faible dose, au contraire, et surtout dans le cas de l'*Aucuba*, les vapeurs de formol et d'acroléine provoquent une hydrolyse assez considérable de l'hétéroside (néanmoins plus faible et plus lente que dans le cas du chloroforme ou de l'éther). Les produits fermentaires correspondants sont d'activité sensiblement égale à celle des témoins.

Dans ces conditions, l'action du formol et de l'acroléine se rapprocheraient donc de celle du chloroforme et de l'éther.

2° Bien que moins poussée, l'étude de la RHAMNODIASTASE et de la MYROSINE nous amène à des conclusions analogues.

Sous l'influence du chloroforme et de l'éther il y a aussi, chez les végétaux (Gaulthérie, graines d'Avignon) contenant des hétérosides dédoublables par la rhamnodiastase, une hydrolyse.

Signalons cependant le cas particulier de la Rue, contenant du rutoside, mais chez laquelle nous n'avons pu mettre en évidence le ferment capable d'hydrolyser cet hétéroside, et dans ce cas, le chloroforme et l'éther sont restés sans action.

3° Lors de nos expériences sur les graines de Moutarde noire, nous avons constaté, sous l'influence des vapeurs anesthésiques, une augmentation de l'essence de Moutarde provenant vraisemblablement d'une augmentation de l'hétéroside correspondant : le sinigroside, tributaire de la myrosine. Ce fait est à rapprocher de l'augmentation d'acide cyanhydrique chez

les feuilles de Laurier-cerise traitées par les anesthésiques. Ici encore, il y aurait donc synthèse *in vivo* sous l'influence des vapeurs de chloroforme ou d'éther dans certaines conditions.

4° Avec l'INVERTINE OU SUCRASE, diastase hydrolysante d'holosides, particulièrement du saccharose, nous avons eu des résultats légèrement différents de ceux obtenus avec les hétérosidases.

a) *In vitro*, le chloroforme et l'éther sont pratiquement sans action sur l'activité hydrolysante vis-à-vis du saccharose.

Quant au formol et à l'acroléine, ils sont beaucoup moins nocifs que dans le cas de l'émulsine, il faut atteindre des concentrations beaucoup plus fortes (5 à 10 p. 100) pour retarder l'hydrolyse du saccharose.

Quant au mode d'action, il semble être, comme dans le cas de l'émulsine, d'ordre physique et consisterait en une modification de l'état colloïdal (agglomération des micelles diastasiques).

In vivo, quel que soit le végétal envisagé (Bananes, feuilles de Laurier-cerise, d'*Aucuba*, de Rue, de Gauthérie) il y a hydrolyse du saccharose, ou tout au moins d'holosides tributaires de la sucrase, sous l'influence des substances envisagées (chloroforme, éther, formol, acroléine). Cette hydrolyse peut être totale si l'on prolonge suffisamment la durée de l'expérience.

Cependant, signalons que, dans certaines conditions, en particulier au début de l'action de ces substances agissant en vapeur saturante, la méthode biochimique nous a permis de constater qu'il y avait non pas diminution mais au contraire augmentation des holosides tributaires de l'invertine. Sans qu'on puisse l'affirmer, puisque nous n'avons pas extrait ces holosides, il semble qu'il y ait, dans certains cas, synthèse *in vivo* du saccharose sous l'influence des substances volatiles employées, synthèse qui paraît bien avoir été réalisée récemment *in vitro*, à l'aide de la sucrase, par OPARIN et KURSANOW.

Donc il peut y avoir *synthèse d'holosides, tributaires de l'invertine, in vivo* et sous l'influence des diverses vapeurs étudiées. Nous avons déjà constaté un phénomène analogue à propos des hétérosides tributaires de l'émulsine.

Remarquons que dans le cas de l'invertine, le formol et l'acroléine ne sont plus des inhibiteurs *in vivo* (nous avons vu précédemment que, tout au moins à dose moyenne, ce n'était pas non plus des inhibiteurs *in vitro*). Comme le chlo-

roforme et l'éther, ils stimulent à la fois l'activité hydrolysante et synthétisante de l'invertine *in vivo*. La sucrase vis-à-vis du formol et de l'acroléine se comporte donc différemment de l'émulsine.

Quant à l'état de la sucrase *in vivo* le fait que les tissus ne cèdent généralement pas leur invertine à l'eau et que le chloroforme et l'éther sont sans action *in vitro* nous conduisent à envisager (comme pour l'émulsine) l'existence d'un complexe diastasique, mais ce complexe ne serait pas de même nature que dans le cas de l'émulsine (ce qui expliquerait les résultats différents obtenus avec ces deux ferments) et les expériences de WILLSTAETTER montrant que l'invertine de levure est liée, non à des protides, mais à des glucides, donne quelque vraisemblance à cette hypothèse.

En ce qui concerne le mécanisme d'action, tant au point de vue de l'hydrolyse que de la synthèse d'holosides sous l'influence des différentes vapeurs étudiées, nous croyons qu'il est analogue à ce qui a lieu dans le cas de l'émulsine, nous n'y reviendrons donc pas.

5° Quant à l'AMYLASE, elle semble se comporter comme l'invertine, mais les variations de l'amidon observés sous l'influence des substances volatiles étudiées sont assez faibles. Cela tient peut être à ce que l'amidon se trouve, non à l'état dissous dans les vacuoles, mais à l'état figuré sur les plastes.

Sous l'influence du chloroforme et de l'éther, on constate au début de l'action une synthèse, puis si l'on prolonge la durée de l'expérience, une hydrolyse de l'amidon, ou tout au moins d'holosides tributaires de l'amylase. Notons que les variations observées avec l'éther sont plus marquées que dans le cas du chloroforme, fait d'ailleurs en accord avec ce qui se passe *in vitro* ; l'extrait de malt soumis à l'action du chloroforme donne un produit fermentaire moins actif que dans le cas de l'éther.

Les modifications observées avec le formol et l'acroléine sont de même sens, mais moins marquées ; cela tient sans doute à une légère inactivation de l'amylase *in vivo*, fait qu'on retrouve *in vitro*.

Ces expériences bien qu'incomplètes nous apportent cependant un certain nombre de faits au sujet des modifications des processus synthétisant et hydrolysant, tributaires des glucidases, sous l'influence de certains corps organiques volatils.

Elles nous ont permis d'autre part, par la comparaison des résultats obtenus au point de vue biochimique avec les modifications apportées à la structure de la cellule végétale, de poser, sous une forme encore hypothétique, le problème des complexes diastatiques intracellulaires. Nous pensons que de nouvelles recherches faites à ce double point de vue peuvent conduire à des résultats intéressants en physiologie végétale, et nous nous proposons d'ailleurs de poursuivre ces expériences.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

1. ARMSTRONG (H. E.). — The origin of osmotic effects. III. The function of hormones in stimulating enzyme change in relation to narcosis and the phenomena of degenerative and regenerative change in living structure. *Proc. of the Roy. Soc.*, sér. B, 1910, **82**, 588.
2. ARMSTRONG (H. E.) and ARMSTRONG (E. F.). — The function of hormones in regulating metabolism. *Annals of Botany*, 1911, **25**, 507.
3. ARMSTRONG (H. E.), ARMSTRONG (E. F.) and HORTON (E.). — Studies on enzyme action. XVI. The enzymes of emulsin (1), Prunase the correlate of Prunasin. *Proc. of the Roy. Soc.*, sér. B, 1912, **85**, 359.
4. ARMSTRONG (H. E.), ARMSTRONG (E. F.) and HORTON (E.). — Studies on enzyme action. XVII. Enzymes of the emulsine type (1). Distribution of β enzymes in plants, *Proc. of the Roy. Soc.*, sér. B, 1912, **85**, 363.
5. ARMSTRONG (H. E.) and EYRE. — Studies on enzyme action. XVIII. Enzymes of the emulsine type (3). Linase and other enzymes in *Linacæe*. *Proc. of the Roy. Soc.*, ser. B, 1912, **85**, 370.
6. ARTOM (M. C.). — Remarque sur la classification, la nomenclature et l'évaluation quantitative des facteurs secondaires modifiant les réactions diastasiques. *IV^e Congrès de Chimie Biologique*, 1 vol., Paris, Masson, 1933, 445.
7. ASTRUC (A.) et RENAUD (A.). — Nouvelles précisions relatives à la fécule destinée aux essais diastasiques. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1923, (7), **27**, 333.
8. AUGEN (A.). — Les glucides des Iris (nature, genèse et transformations). *Rev. Gén. de Bot.*, 1928, **40**, 456.
9. BAILEY (Em.). — Biochemical studies on the Banana. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1912, **34**, 1706.
10. BARRENCHEN und PANY. — Ueber die Rolle der Phosphorylierung in intermediären Kohlenhydrats Stoffwechsel der Pflanze. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **219**, 364.
11. BERTRAND (G.) et COMPTON (A.). — Action de la chaleur sur l'emulsine. *C. R. Ac. Sc.*, 1911, **152**, 1518. *Ann. Inst. Pasteur*, 1912, **26**, 161.
12. BERTRAND (G.) et COMPTON (A.). — Sur une modification de l'amygdalase et de l'amygdalinase due au vieillissement. *C. R. Ac. Sc.*, 1914, **139**, 434.
13. BERTRAND (G.) et THOMAS (P.). — *Guide pour les manipulations de Chimie biologique*. 1 vol., Paris, Dunod, 1910.

14. BESQUEUT (L.). — Contribution à l'étude de la graine, du tourteau et de l'huile de Lin. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1931.
15. BOIVIN (R.). — Recherches sur la formation et le dosage de l'essence sulfurée dans la Moutarde noire et l'Alliaire officinale. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1928.
16. BOKORNY (Th.). — Action des antiseptiques sur les ferments de la Levure. *Allgem. Bran. Hopf. Zeitschr.*, 1918, **58**, 1093 d'après *Journ. Pharm. et Chim.*, 1919, (7), **19**, 360.
17. BOKORNY (Th.). — Ber. d. d. bot. Gesell., 1891, **9**. *Chem. Zeit.*, 1903. *Pflüg. Arch.*, 1908, **125**. 1909, **128**. *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **36**, d'après R. COMBES [78].
18. BOKORNY (Th.). — Ueber den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Keimung der Pflanzensamen. Wachstumsförderung durch einige. *Biochem. Zeitschr.*, 1913, **50**, 148.
19. BOUGAULT (J.). et GROS (R.). — Nouvelles applications analytiques du réactif de Nessler. Dosage des aldéhydes. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1927, (7), **26**, 5.
20. BOURDIER (L.). — Sur la présence de l'aucubine dans les différentes espèces du genre *Plantago*. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1907, (6), **26**, 194.
21. BOURDOUIL (Mlle C.). — Sur la variation de composition de la Banane au cours de la maturation. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **9**, 1130.
22. BOURDOUIL (Mlle C.). — Sur une méthode biochimique de dosage de l'amidon dans les plantes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 809.
23. BOURQUELOT (Em.). — Sur les caractères de l'affaiblissement éprouvé par la diastase sous l'action de la chaleur. *C. R. Ac. Sc.*, 1887, **104**, 576.
24. BOURQUELOT (Em.). — Sur les ferments solubles sécrétés par l'*Apergillus niger*. *C. R. Soc. Biol.*, 1893, 653.
25. BOURQUELOT (Em.). — L'émulsine des Champignons. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1895, (6), **2**, 435.
26. BOURQUELOT (Em.). — Recherche dans les végétaux du sucre de Canne à l'aide de l'invertine et des glucosides à l'aide de l'émulsine. *C. R. Ac. Sc.*, 1901, **133**, 690. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1901, (6), **14**, 481.
27. BOURQUELOT (Em.). — Sur la recherche dans les végétaux des glucosides hydrolysables par l'émulsine. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1906, (6), **23**, 369.
28. BOURQUELOT (Em.). — Sur l'emploi des enzymes comme réactifs dans les recherches de laboratoires. II. Enzymes hydratantes. Hydratases. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1907, (6), **25**, 16 et 378.
29. BOURQUELOT (Em.) et BRIDEL (M.). — Analyse d'un tubercule de *Dioscorea Macabilia* provenant de Madagascar. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1908, (6), **28**, 494.
30. BOURQUELOT (Em.) et BRIDEL (M.). — De l'action hydrolysante et de l'action synthétisante de l'émulsine dans l'alcool méthylique. Obtention du méthylglucoside β . *Journ. Pharm. et Chim.*, 1912, (7), **6**, 56.
31. BOURQUELOT (Em.) et BRIDEL (M.). — Action de l'émulsine sur la salicine en milieu alcoolique. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1912, (7), **5**, 388.

32. BOURQUELOT (Em.) et BRIDEL (M.). — Sur une réaction synthétisante de l'émulsine. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1912, (7), **5**, 569.
33. BOURQUELOT (Em.) et DANJOU. — Influence de quelques anti-septiques sur l'activité de l'émulsine. *C. R. Soc. Biol.*, 1906, **61**, 442.
34. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — Sur un glucoside nouveau, l'aucubine, retiré des graines d'*Aucuba japonica*. *C. R. Ac. Sc.*, 1902, **134**, 1441.
35. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — L'émulsine telle qu'on l'obtient avec les amandes est un mélange de plusieurs ferments. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, **55**, 219.
36. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — Sur l'aucubine, glucoside de l'*Aucuba Japonica* L. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1905, (6), **21**, 46. *Ann. Chim. Phys.*, 1905, **4**, 289.
37. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — Sur l'origine et la composition de l'essence de Benoite, glucoside et enzyme nouveaux. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1905, (6), **21**, 481.
38. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — Du choix de la levure dans l'application des procédés biochimiques à la recherche des sucres et des glucosides. *Journ. Pharm. et Chim.* 1912, (7), **6**, 246.
39. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — Synthèses de galactosides d'alcools à l'aide de l'émulsine. Ethylgalactoside β . *Journ. Pharm. et Chim.*, 1912, (7), **5**, 385.
40. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine. X. Synthèse biochimique d'un glucoside isomère de la salicine : le salicylglucoside β . *Journ. Pharm. et Chim.*, 1913, (7), **8**, 49.
41. BOURQUELOT (Em.) et HÉRISSEY (H.). — Synthèse de galactosides d'alcools à l'aide de l'émulsine. Méthylgalactoside β et allylgalactoside β . *Journ. Pharm. et Chim.*, 1913, (7), **7**, 444.
42. BOURQUELOT (Em.) et VERDON (E.). — De l'emploi de proportions croissantes de glucose dans la synthèse biochimique du méthylglucoside β . *Journ. Pharm. et Chim.*, 1913, (7), **7**, 575.
43. BOUTRON et FRÉMY. — Recherches sur les semences de Moutarde noire et blanche. *C. R. Ac. Sc.*, 1839, **9**, 817.
44. BRAECKE (Mlle M.). — Sur la présence d'aucubine et de mélampyre dans plusieurs espèces de Mélampyres. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 207.
45. BRAECKE (Mlle M.). — Sur la présence d'aucubine et de mannite dans les tiges foliées de *Rhinantus Crista-Galli* L. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 258.
46. BRIDEL (M.). — Remarques sur la préparation de l'eau distillée de Laurier-cerise. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1907, (6), 22.
47. BRIDEL (M.). — Etude biochimique sur la composition du *Monotropa hypopitys*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 722 et 918.
48. BRIDEL (M.). — Sur la véritable nature du glucoside à salicylate de méthyle existant dans l'écorce de *Betula leuta* L.. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 659.
49. BRIDEL (M.). — Sur l'hydrolyse fermentaire du monotropitosite (Monotropitine). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, **7**, 52.

50. BRIDEL (M.). — Recherche sur les variations de coloration des plantes au cours de leur dessiccation. Le glucoside du *Lathraea clandestina* L. est l'aucuboside (aucubine). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 620.
51. BRIDEL (M.). — La structure des oses et des diholosides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 1015.
52. BRIDEL (M.) et ARNOLD (R.). — Sur l'emploi de divers agents de précipitation dans la préparation de l'émulsine des amandes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1920, **2**, 216.
53. BRIDEL (M.) et CHARAUX (C.). — Le produit fermentaire extrait des graines de divers *Rhamnus* ou rhamnodiastase. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 35.
54. BRIDEL (M.) et CHARAUX (C.). — Méthode biochimique de recherche dans les végétaux, des glucosides hydrolysables par la rhamnodiastase. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 48.
55. BRIDEL (M.) et DESMAREST (Mlle M.). — Sur la conservation des propriétés de l'émulsine des Amandes. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1928, (8), **10**, 153.
56. BRIDEL (M.) et DESMAREST (Mlle M.). — Sur un procédé permettant d'extraire l'émulsine du tourteau d'Amande amère. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, (8), **10**, 373.
57. BRIDEL (M.) et GRILLON (Mlle S.). — Le glucoside à salicylate de méthyle du *Gaultheria procumbens* L. est le monotropitoside. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, 1326.
58. BRIDEL (M.) et GRILLON (Mlle S.). — Sur la présence de notables quantités de monotropitoside dans le *Gaultheria procumbens* L. après dessiccation. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 466.
59. BUIGNET. — Recherches sur la matière sucrée contenue dans les fruits acides. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1861, (3), 81.
60. BURKARD und NEUBERG. — Zur Frage der Entstehung des Rohrzuckers. *Biochem. Zetschr.*, 1934, **270**, 329.
61. BUSSY. — Sur la formation de l'huile essentielle de Moutarde. *Journ. Pharm.*, 1840, **26**, 39.
62. CHARAUX (C.). — Sur le dédoublement biochimique de la rutine. Rutinose, nouveau biose provenant de ce dédoublement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, **6**, 631.
63. CHARAUX (C.). — Sur la présence de rutine dans certains végétaux. Préparation et identification de ce glucoside et de ses produits de dédoublement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, **6**, 641.
64. CHARAUX (C.). — Sur la nature du glucoside cyanhydrique existant dans les jeunes pousses du Laurier-cerise et quelques autres Rosacées. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 711.
65. CHAUDUN (Mlle A.). — Hydrolyse diastasique du saccharose en présence de formol. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **18**, 519.
66. CHEYMOL (J.). — Composition chimique de la racine de *Geum urbanum* L. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1926.
67. CHIBNALL (A.-C.). — A new method for the separate extraction of vacuole and protoplasmic material from leaf cells. *Journ. of biol. Chem.*, 1923, **55**, 333.
68. CLARK. — Blackening of leaves of wild Indigo. *Journ. of biol. Chem.*, 1915, **21**, 615.

69. CLERC (A.), PARIS (R.), DESCHAMP (P.N.) et STERNE (J.). -- Sur la mesure de la tension superficielle du sang par un procédé stalagmométrique spécial. *C. R. Soc. biol.*, 1933, **112**, 779.
70. COLIN (H.). -- Préparation facile d'une solution de sucrase très active. *Bull. Assoc. Chimist. Sucr. et Distill.*, 1917, **35**, 85.
71. COLIN (H.). -- Action de la sucrase sur les satellites de l'inuline. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1920, **2**, 157.
72. COLIN (H.). -- La genèse des hydrates de carbone chez les végétaux. *Rev. des Quest. Sc.*, 1926, **10**, 277.
73. COLIN (H.). -- *Les diastases. Tome I. Les hydrolases*, 1 vol., Paris, Doin, 1931.
74. COLIN (H.) et BELVAL. -- Le titre acidimétrique et le pouvoir hydrolysant des sucres végétaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, 165.
75. COLIN (H.) et CHAUDUN (Mlle A.). -- Action comparée des acides et des enzymes dans les phénomènes d'hydrolyse. *Journ. Chim., Phys.* 1923, **20**, 471.
76. COLIN (H.) et CHAUDUN (Mlle A.). -- Action inhibitrice de certains produits sur l'hydrolyse diastasique du saccharose. *Journ. Chim. Phys.*, 1931, **28**, 546.
77. COLIN (H.) et RICHARD (P.). -- Préparation et propriétés de la laminarine (laminaroholoside) de *Laminaria flexicaulis*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 88.
78. COMBES (R.). -- *La vie de la cellule végétale*, 2 vol., Paris, A. Colin, 1927 et 1929.
- 78 a. COMBES (R.). -- Contribution à l'étude biochimique du forçage des plantes ligneuses. *Rev. Gén. de Bot.*, 1933, **45**, 133.
79. COURTOIS (J.). -- La synthèse biochimique du saccharose. *Journ. Pharm. et Chim.* 1934, (8), **20**, 527.
80. COWDRY (E. V.). -- Surface film theory of the function of mitochondria. *Amer Naturalist.*, 1926 d'après E. GRYNFELTT, **110**.
81. DE CUGNAC (A.). -- Recherche sur les glucides des Graminées. *Th. Doct. ès-Sc.*, Paris, 1930.
82. DENIGÈS (G.). -- Nouvelle méthode pour le dosage de l'acide cyanhydrique. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1894, (3) **29**, 10 et 64.
83. DENNY (F. E.). -- Chemical changes induced in Potato tubers by treatments that break the rest period. *Amer Journ. of Bot.*, 1929, **16**, 816.
84. DENNY (F. E.). -- Sucrose and starch changes induced in Potato tubers by treatments that break the rest period. *Amer Journ. of Bot.*, 1930, **17** 326.
85. DENNY (F. E.). -- Shortening the rest period of *Gladiolus* by treatment with chemicals. *Amer Journ. of Bot.*, 1930, **17**, 602.
86. DENNY (F. E.), MILLER (L. P.) and GUTHRIE (J. D.). -- Enzyme activities of juice from Potatoes treated with chemical that break the rest period. *Amer. Journ. of Bot.*, 1930, **17**, 483.
87. DE SAINT STÉBAN (G.). -- Application du procédé biochimique de caractérisation du glucose à quelques extraits de la pharmacopée française. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1922.
88. DOMERGUE (A.). -- Titration de la farine de Moutarde. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1911, (6), **4**, 494.

89. DUBOIS (Raphaël). — d'après *Dict. Physiol.* de RICHET. Article Hydratation.
90. DUNSTAN (W.), HENRY (T. A.) and AULD (S. S. M.). — The occurrence of Phaseolunatin in common Flax. *Proc. of the Roy. Soc.*, 1906, sér. B, **78**, 145.
91. EULER (H. VON) und MYRBÄCK (K.). — Ueber die Inaktivierung der saccharase durch p. phenyldiamin, p. toluidin und durch formaldehyd. *Zeitschr. für physiol. chem.*, 1923, **125**, 296.
92. EULER (H. VON) und SVANBERG (O.). — Versuche zur Darstellung aktiver Saccharasepräparate. *Zeitsch. für physiol. Chem.* 1919, **107**, 259.
93. FABRE (R.) et PÉNAU (H.). — Recherche sur les ferments amylolytiques. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1923, (7), **28**, 289 et 341.
94. FABRE (R.) et SIMONNET. — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction. IV. Recherches sur la Levure de bière. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 923.
95. FICHTENHOLZ (Mlle A.). — Recherches relatives à l'action retardatrice de quelques composés sur l'hydrolyse des glucosides par l'émulsine. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1903, (6), **30**, 99.
96. FICHTENHOLZ (Mlle A.). — Application de la méthode biochimique à l'analyse de la Busserole. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1911, (7), **14**, 441.
97. FISCHER (Em.). — Ueber ein neues dem amygdalin ähnliches glucosid., *Ber. Chem. Ges.*, 1895, **28**, 1508.
98. FLEURY (P.). — De la diastase de Payen aux diastases actuelles. IV^e Congrès de Chimie biologique., 1^{er} vol., Paris, Masson, 1934, 174.
99. FORDOS et GELIS. — Analyse du cyanure de potassium du commerce. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1853, (3), **23**, 48.
100. FRANQUET (R.). — Le genèse de l'amidon dans quelques plantes à réserves amylacées. *Th. Doct. ès Sc.*, Paris, 1932.
101. GALLIMARD (J.). — Recherches sur les stérols de la Levure de bière. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1934.
102. GARBIT (A.). — Recherche sur l'activité des poudres de Moutarde. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1932.
103. GIASA (J.). — Etude de la décomposition de l'amygdaline au point de vue des réactions fermentaires conjuguées. *Journ. Chim. Phys.*, 1921, **19**, 77.
104. GOIFFON (R.). — Nouveau procédé de mesure de la tension superficielle. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 165.
105. GOLLAN (J.). — Sur la présence de rutoside dans les fleurs fraîches de *Forsythia pendula* L.. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 1154.
106. GORIS (A.). — Localisation et rôle des alcaloïdes et des glucosides chez les végétaux. *Thèse d'Agrégation*, Paris, 1914.
- 106 a. GORIS (A.), MASCRÉ (M.) et VISCHNIAC. — Glucosides et essences de Primevère. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1912, **19**, 577 et 648.
107. GRIMBERT (L.). — Sur l'essai de la Diastase officinale d'après le Codex. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1916, (7), **13**, 5.
108. GROS (R.). — Sur les méthodes de dosage de l'aldéhyde formique par oxydation. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1922, (7), **26**, 415.

109. GROS (R.) et PICHON (G.). — Dosage de l'allylsénévol dans la farine de Moutarde. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1934, (8), **19**, 249.
110. GRYNFELT (E.). — Morphologie cellulaire et cancer. *Biol. Médic.*, 1935, **25**, 353.
111. GUÉRIN (P.). — L'action des anesthésiques, du froid et des rayons ultra-violet sur certaines plantes. *Rev. Scientif.*, 1910, **48**, 804.
112. GUÉRIN (P.) et GORIS (A.). — Une nouvelle plante à coumarine : *Melittis Melissophyllum* L. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 1067.
113. GUÉRIN (P.) et LORMAND (Ch.). — Action du chlore et de diverses vapeurs chez les Végétaux. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 401.
114. GUÉRIN (P.) et LORMAND (Ch.). — Action plasmolysante d'un certain nombre de vapeurs. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 1598.
115. GUIGNARD (L.). — Sur la localisation chez les Amandes et le Laurier-cerise, des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. *C. R. Ac. Sc.*, 1890, **110**, 477. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1890, (3), **21**, 233 et 289.
116. GUIGNARD (L.). — Sur la localisation des principes actifs des Crucifères, Tropéolées, Linnanthées, Récédacées, etc.. *Journ. Bot.*, 1890, **4**, 3, 21, 385, 412 et 435. 1893, **7**, 345, 393, 417 et 444.
117. GUIGNARD (L.). — Sur quelques propriétés de la myrosine. *Bull. Soc. Bot.*, 1894, **41**, 418.
118. GUIGNARD (L.). — Le Haricot à acide cyanhydrique, *Phaseolus lunatus* L., *C. R. Ac. Sc.*, 1906, **142**, 545. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1906, **13**, 358.
- 118 a. GUIGNARD (L.). — La recherche et le dosage de l'acide cyanhydrique dans les Haricots. *Ann. des Falsif.*, 1916, **9**, 303.
119. GUIGNARD (L.). — Influence de l'anesthésie et du gel sur le doublement de certains glucosides chez les plantes. *C. R. Ac. Sc.*, 1909, **149**, 91.
120. GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL. — *Traité de Cytologie végétale*, 1 vol., Paris, Le François, 1933.
121. HARANG (P.). — Recherche et dosage du tréhalose dans les végétaux à l'aide de la tréhalase. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1906, (6), **23**, 16.
122. HECKEL (E.). — Influence des anesthésiques et du gel sur les plantes à coumarine. *C. R. Ac. Sc.*, 1909, **149**, 829.
123. HECKEL (E.). — De l'action du froid et des anesthésiques sur les feuilles de l'*Angraecum fragrans* Thou. (Faham) et sur les gousses vertes de Vanille. *C. R. Ac. Sc.*, 1910, **151**, 128.
124. HECKEL (E.). — De l'action du froid, du chloroforme et de l'éther sur l'*Eupatorium triplinerve* Vahl. (Aya-Pana). *C. R. Ac. Sc.*, 1911, **152**, 1825.
125. HEIDUSCHKA (M.) und ZIRKEL (H.). — Ueber die Einwirkung von Formaldehyd auf Lactose, Maltose und Saccharose. *Arch. der Pharm.*, 1916, **254**, 546.
126. HELFERICH (B.). — Ueber Emulsin. I. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1921, **117**, 159.
127. HELFERICH (B.), SPEIDEL (P. E.) und TOELDIE (W.). — Ueber Emulsin. II. Mitteilung. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1923, **128**, 99.

128. HELFERICH (B.) und BREDEREK (H.). — Ueber Emulsin. III. Mitteilung. *Zeitschr. für Chem.*, 1930, **189**, 273.
129. HELFERICH (B.) und WINKLERS (S.). — Ueber Emulsion. XII. 4. Der Einfluss von formalin auf die β glucosidatische und β galactosidatische wirkung der Emulsin. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1933, **221**, 98.
130. HELFERICH (B.), WINKLERS (S.), HILLEBRECHT und BACH (H.). — Ueber Emulsin. XVII. Einwirkung von ozon auf Mandel-emulsin. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1934, **239**, 112.
131. HÉRISSEY (H.). — Recherches sur l'émulsine. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1889.
132. HÉRISSEY (H.). — Sur la prulaurasine, glucoside cristallisé retiré des feuilles de Laurier-cerise. *C. R. Ac. Sc.*, 1905, **141**, 959. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1906, (6), **23**, 5.
133. HÉRISSEY (H.). — Essai d'utilisation par l'*Aspergillus niger*, du géoside, glucoside générateur d'engénol contenu dans la racine de *Geum urbanum*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 943.
134. HÉRISSEY (H.) et CHALMETTA (A.). — Sur le dosage des sucres réducteurs et en particulier du glucose, par les liqueurs cuproalcalines en présence d'acide cyanhydrique. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1928, (7), 393.
135. HOFFMANN (E.). — Ueber Emulsin. *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **267**, 309 ; 1934, **272**, 426.
136. HUDSON (S.) and PARDIE (H. S.). — The hydrolysis of salicin by the enzyme emulsin. *Journ. of the Amer. Chem. Soc.*, 1909, Bd. **31**, 1243.
137. JAVILLIER (M.) et TCHERNOKOUTSKY (Mme). — L'amygdalase et l'amygdalinase chez l'*Aspergillus niger* et quelques Hyphomycètes voisins. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1913, **20**, 132.
138. JESENKO (Fr.). — Einige neue Verfahren, die Ruheperiode der Holzgewächse abzukürzen. *Ber. der Deutsch. Bot.*, 1911, **29**, 273.
139. JORISSEN (A.) et HAIRS. — La linamarine, nouveau glucoside fournissant de l'acide cyanhydrique par dédoublement et retiré du *Linum usitatissimum*. *Bull. Ac. Roy. Sc. de Belgique* 1891, (3), **21**, 529.
140. KARIYONE (T.) und KONDO (K.). — Untersuchung über Aucubin. *Journ. Pharm. Soc. Japan*, 1928, **48**, 679.
141. KOHN-ABREST (E.) et RICARDONI. — Nouvelle méthode de dosage de l'acide cyanhydrique des végétaux cyanogénétiques. *Ann. des Falsif.*, 1923, **16**, 583.
142. LANGLOIS (J.). — De la synthèse et de l'hydrolyse biochimique de quelques alcool-xylosides β . *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1932.
143. LEBAS (C.). — Sur la présence d'aucubine dans diverses variétés d'*Aucuba japonica*. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1909, (6), **30**, 390.
144. LEBAS (C.). — Dosage de l'aucubine dans les divers organes de l'*Aucuba japonica*. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1911.
145. LECOMTE DU NOÛY. — *Equilibres superficiels des solutions colloïdales*. 1 vol., Paris, Masson, 1929.

146. LIEBIG (J.). — Verfahren zur Bestimmung des Blausäuregehaltes der medicinischen Blausäure, des Bittermandel und Kirschklorkerwasser. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1861, (3), **19**, 277. *Annalen*, 1851, **77**, 102.
147. LOESECKE (H. VON). — Quantitative changes in the chloroplast pigments in the peel of Bananas during ripening. *Amer. Journ. of the Chem. Soc.*, 1929, **51**, 2439.
148. MAIGE. — Amylogénèse et amyolyse dans les cellules végétales. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, 422.
149. MAQUENNE (L.) et DEMOUSSY (E.). — Sur le noircissement des feuilles vertes. *C. R. Ac. Sc.*, 1909, **149**, 957.
150. MAQUENNE (L.) et DEMOUSSY (E.). — Résistance des feuilles à l'asphyxie. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, 571.
151. MASCRÉ (M.) et BOUCHARA (E.). — Influence du formol sur la précipitation des matières albuminoïdes du lait. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 994.
152. MASCRÉ (M.) et HERBAIN (H.). — Influence du formol sur la précipitation des protides sériques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 978.
153. MASCRÉ (M.) et PARIS (R.). — Action du formol sur l'émulsine et l'invertine. *C. R. Ac. Sc.*, 1933, **196**, 438. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, 918.
154. MASCRÉ (M.) et PICARD (P.). — Action de l'éther et du chloroforme sur la structure de la cellule végétale. *Bull. Soc. bot. de France*, 1933, **80**, 326.
155. MASCRÉ (M.) et POUSSET (M.). — Action des vapeurs de chloroforme, d'éther et de benzène sur les constituants glucidiques de la feuille d'*Aucuba japonica* Thunb. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1933, **40**, 257.
156. MAZÉ. — Action du chloroforme et de l'éther sur l'inversion du saccharose de la racine de Betterave. *C. R. Soc. Biol.*, 1914, (2), **77**, 549.
157. MEUNIER (A.). — Contribution à l'étude des glucidases dans quelques espèces indigènes du genre « *Lathyrus* » (*Papilionacées*). *Th. Doct. ès-Sc.*, Nancy, 1933.
158. MIRANDE (M.). — Influence exercée par certaines vapeurs sur la cyanogénèse végétale. Procédé rapide pour la recherche des plantes à acide cyanhydrique. *C. R. Ac. Sc.*, 1909, **149**, 140.
159. MIRANDE (M.). — De l'action des vapeurs sur les plantes vertes. *C. A. Ac. Sc.*, 1910, **151**, 481.
160. MOUGNE (M.). — Recherche de la glucosidase β dans le règne végétal. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1917, (7), **15**, 339.
161. MYRBÄCK (K.). — Ueber verbindungen einiger Enzyme mit inaktivierenden Stoff. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1925, **125**, 296.
162. NADSON (G. A.) et MEISL (M. N.). — Le mécanisme d'action du chloroforme sur la matière vivante. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, **183**, 82.
163. NELSON (J. M.) and BORN (S.). — A Study of the chemical constitution of invertase. *Amer. Chem. Soc.*, 1914, **36**, 393.
164. NEYRON (C.). — Recherche sur le principe fermentescible des tubercules d'Asphodèle. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1930, **37**, 538 et 1931, **38**, 38.

165. OHLSSON (E.). — Les diastases des graines végétales. *Le IV^e Congrès de Chimie biologique*, 1 vol., Paris, Masson, 1933, 366.
166. OHTA. — Darstellung von enveiszfreien Emulsin. *Biochem. Zeitschr.*, 1914, **58**, 329.
167. OPARIN (A.) and KURSANOW (A.). — Ueber die enzymatische Synthese des Rohrzuckers. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **239**, 1.
168. OPPENHEIMER. — Fermente und ihre Wirkung. 2 vol., Leipzig, 1925, 5^e édit.
169. PARAT (M.). — Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasme, d'après E. GRYNFELT [110].
170. PAYEN et PERSOZ. — Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels. *Ann. Chim.*, 1833, **53**, 73, d'après FLEURY (P.) [98].
171. PECHE. — Microchemischer nach weiss der cyanwasser Stoffsaure in *Prunus Laurocerasus*. *Sitzungsl. K. Akad. Wien.*, 1912, **121**, 33, d'après WILLAMAN [197].
172. PÉNAU (H.) et AUDIC (R.). — Matières passives normales pour le dosage des ferments solubles pharmaceutiques. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1934, (8), **29**, 329.
173. PERROT (Em.) et GORIS (A.). — La stérilisation des plantes médicinales dans ses rapports avec leur activité thérapeutique. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1909, **16**, 380.
174. PICARD (P.). — Action de l'éther et du chloroforme sur la structure de la cellule végétale. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1933.
175. POE. (C. F.), LOVLEY and WITH. — Effect of certain preservatives on the determination of sucrose by invertase method. *Ind. eng. Chem. Anal.*, 1933, **5**, 309.
176. POUSSET (M.). — Des modifications du contingent glucidique de quelques organes végétaux sous l'influence des vapeurs de chloroforme, d'éther et de benzène. *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1933.
177. PRINGSHEIM (H.) und FUCHS (W.). — Ueber eine Komplement der Amylasen. *Ber. Chem. Ges.*, 1923, **56**, 1762.
178. PROCTER (W.). — Observations on the volatile oil of *Betula lenta* and on Gaultherin, a substance which, by its decomposition, yield that oil. *Amer. Journ. Pharmacol.*, 1843, **15**, 241.
179. QUETEL (R.). — Le mécanisme du forçage des végétaux par les vapeurs d'éther, comporte-t-il une déshydratation des tissus ? *C. R. Ac. Sc.*, 1933, **196**, 1629.
- 179 a. QUETEL (R.). — Les variations de la teneur en azote chez le Lilas au cours du forçage. *C. R. Ac. Sc.*, 1933, **196**, 1243.
180. RABATÉ (Mme S.). — Contribution à l'étude chimique de la Gaulthérie. (*Gaultheria procumbens*). *Th. Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1930.
181. RABATÉ (J.). — Contribution à l'étude biochimique des Salicacées. *Th. Doct. ès-Sc.*, Paris, 1934.
182. PICARD (P.). — Les constituants glucidique des Algues brunes. *Th. Doct. ès-Sc.*, Paris, 1930.
183. ROBIQUET. — Procès-verbal de la séance du 7 mars 1838 de la Société de Pharmacie de Paris. *Journ. de Pharm. et des Sc. Access.*, 1838, **24**, 196, d'après P. FLEURY [98].

184. ROSENTHALER and SEILER. — Ueber die Localisation der blausäure Glykoside und der Emulsin in bitteren Mandeln und Kirschblättern. *Ber. der. Deutsch. Pharm. Gen.*, 1922, **32**, 245.
185. SCHMIDT (E.). — Zur Kenntniss der Rhamnoside. *Archiv. der Pharm.*, 1904, **242**, 210, d'après CHARAUX (C.) [63].
186. SHERMANN (H. C.) and WAYMANN (Mlle M.). — Effect of certain antiseptics upon the activity of amylases. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1921, **42**, 2454.
187. SHERMANN (H. C.) and WALKER (F.). — The influence of certain aminoacids upon the enzymes hydrolysis of starch. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1921, **42**, 2461.
188. STEIN. — *Journ. für Prakt. Chem.*, 1868, **105**, 97 et 1869, **106**, 1, d'après CHARAUX (C.) [63].
189. TALLARICO. — *Archivio die farmacologia sperimentale e. Sc. Aff.*, 1908, **7**, 27, d'après BOURDOUIL (Mlle C.) [21].
190. TANRET (C. et G.). — Sur le rhamninose. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1899, **21**, 1065. *C. R. Ac. Sc.*, 1899, **129**, 715.
191. TANRET (C. et G.). — Sur la rhamninase et la rhamnoxanthine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1899, **21**, 1073.
192. VELLUZ (L.). — Application de la diméthylidihydrorésorcine (dimédon) à l'étude des toxines formolées. *C. R. Soc. biol.*, 1932, **111**, 229.
193. VINTILESCO (J.). — Recherches biochimiques sur quelques sucres et glucosides. *Th. Doct. ès-Sc.*, Paris, 1910.
194. WALLER. — A new method for the quantitative estimation of hydrocyanic acid. *Proc. of the Roy. Soc., ser. B*, 1909, **82**, 574.
195. WEBER (F.). — Methoden des Frühtreibens von Pflanzen in : ABERHALDEN (Ein.) *Arbeitsmethoden*, Berlin, 1924, (1), **11**, 591.
196. WEISS (A.). — Ueber das Rutin, vorgetragen beim Apotheker Grenium für Mittelfranken in Baiern. *Pharmaceutische Centralblatt*, 1842, (11), **13**, 903.
197. WILLAMAN (E.). — The estimation of hydrocyanic acid and the probable form in which it occurs in *Sorghum Vulgare*. *Journ. of Biol. Chem.*, 1917, **29**, 24.
198. WILLAMAN (E.). — The effects of anesthesies and frosting on the cyanogenetic compound of *Sorghum Vulgare*. *Journ. of Biol. Chem.*, 1919, **29**, 37.
199. WILLSTAETTER (W.). — Zur Enzymechemischen Methodik. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1934, **229**, 241.
200. WILLSTAETTER (W.) und CSANYI. — Zur Kenntniss der Emulsin. *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1921, **117**, 172.
201. WILLSTAETTER (W.) und RACKE. — Zur Kenntniss des Invertin. *Lieb. Ann.*, 1921, **427**, 111.
202. WÖHLER und LIEBIG. — Ueber Bildung des Bittermandelsöls. *Lieb. Ann.*, 1837, **22**, 1, d'après FLEURY (P.) [98].
203. WUNDERLICH (H.). — Ueber das Fagopyrum Rutin. *Archiv. Pharm.*, 1908, **24E**, 241.

DEUXIÈME THÈSE.

Proposition donnée par la Faculté :

Rôle biologique des flavines

Vu et approuvé :

Paris, le 13 Novembre 1935.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Ch. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER

